



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**EFFECTO DE LA DIETA CETOGENICA SOBRE LA EXPRESION
DEL COTRANSPORTADOR CATION-CLORO KCC2 EN EL
GIRO DENTADO DE LA RATA**

NEUROCIENCIAS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

BIOLOGA

P R E S E N T A

HERNANDEZ HERNANDEZ GABRIELA

DIRECTORA DE TESIS: DRA. LETICIA GRANADOS ROJAS

LABORATORIO DE NEUROCIENCIAS DEL INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRIA

ASESORA DE TESIS: DRA. MARIA ESTHER CRUZ BELTRAN



CIUDAD DE MEXICO, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo de tesis se realizó en el Laboratorio de Neurociencias de la Torre de

Investigación del Instituto Nacional de Pediatría, bajo la dirección de la Dra. Leticia Granados Rojas

El trabajo forma parte del protocolo vigente titulado “Efecto de la dieta cetogénica sobre la expresión de los co-transportadores catión-cloro NKCC1 y KCC2 en el hipocampo de la rata, posible efecto anticonvulsivo”, con número de registro

085/2010 ante el Comité

de Investigación del Instituto Nacional de Pediatría, cuyo responsable es la Dra. Leticia Granados Rojas. Aprobado por el Comité del Cuidado y Uso de Animales

de

Laboratorio (CICUAL).

El estudio se llevó a cabo con el apoyo de los recursos económicos del proyecto del Fondo Sectorial de CONACYT no. 86784 otorgado a la Dra. Leticia Granados Rojas y del Programa E022 (Fondos Federales modalidad A y B) del Instituto

Nacional de

Pediatría otorgados al proyecto 085/2010 a cargo de la Dra. Leticia Granados Rojas.

AGRADECIMEINTOS.

- Al Instituto Nacional de Pediatría, por permitirme realizar el presente trabajo de tesis en sus instalaciones.
- A la Dra. Leticia Granados Rojas, por su paciencia, tiempo, confianza, dirección y apoyo incondicional para la realización de este proyecto.
- A la Universidad Nacional Autónoma de México y en específico a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, por permitirme desarrollar mis habilidades y trabajo a lo largo de la carrera.
- A la Dra. María Esther Cruz Beltrán, responsable del laboratorio 6 PB de la UMIEZ, de la FES Zaragoza por su tiempo y asesoramiento en la realización de este proyecto.
- A la QFB. Karina Jerónimo Cruz y a la Bióloga Tarsila Elizabeth Juárez Zepeda por el apoyo en el desarrollo del trabajo.
- Al Dr. Miguel Tapia Rodríguez responsable de la Unidad de Microscopía del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, por la asesoría técnica en el manejo del programa ImageJ.
- Al personal del Bioterio: MVZ Raúl Jairo Hernández Valencia y Sr. Gilberto Cárdenas Marcial, por su apoyo técnico.
- A los sinodales: M. en C. Carlos Bautista Reyes, Dra. Leticia Granados Rojas, Dra. María Esther Cruz Beltrán, Dra. María Elena Ayala Escobar y M. en E.S.

María Cristina Alvarado Domínguez, por su tiempo en la revisión de este trabajo.

- A los pasantes de Biología Alexa Carolina Vazquez Vega y Emmanuel Leonardo Bahena Alvarez, por el apoyo y tiempo brindado en la realización de este proyecto.
- Se agradece la subvención otorgada por parte del Programa E022 del Instituto Nacional de Pediatría (Secretaría de Salud), otorgado al Proyecto No. 085/2020 a cargo de la Dra. Leticia Granados Rojas.

DEDICATORIAS.

Dios gracias por estar presente no solo en esta etapa tan importante de mi vida, sino en todo momento.

A mis padres.

Gracias por todo su amor y apoyo incondicional.

Gracias porque siempre me impulsan a ser mejor cada día.

Todo lo que soy es gracias a ustedes, este trabajo es símbolo de todo su esfuerzo y de su infinita dedicación por mí y mis hermanos.

Tía Vero.

Gracias porque siempre estas cuando te necesito.

Erik, Diego.

Hermanitos gracias, porque siempre están conmigo, son una parte muy importante en mi vida y este logro también es gracias a ustedes.

Mi David.

Gracias, porque me has apoyado incondicionalmente en todos los aspectos de mi vida.

Gracias porque siempre estas cuando te necesito.

Gracias por estos siete años llenos de amor.

Mi bebe.

Sofí, gracias porque llegaste a iluminar mi vida de mucha felicidad, y porque me ayudaste a culminar con esta etapa de mi vida.

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
3. MARCO TEÓRICO	3
3.1. Dieta cetogénica	3
3.1.1. Historia de la dieta cetogénica	4
3.1.2. Indicaciones de la dieta cetogénica	5
3.1.3. Efectos adversos de la dieta cetogénica	6
3.1.4. Mecanismos de acción de la dieta cetogénica	7
3.1.5. Tipos de dietas	9
3.1.5.1. Dieta cetogénica clásica	9
3.1.5.2. Dieta Atkins	9
3.1.5.3. Dieta de triglicéridos de cadena media	9
3.2. Sistema Nervioso Central	10
3.2.1. Neuronas	11
3.3. Formación Hipocámpica	13
3.4. Epilepsia	16
3.4.1. Epilepsia Refractaria	18
3.5. Neurotransmisores	19
3.5.1. Ácido gamma-aminobutírico	19
3.6. Cotransportadores	21
3.6.1. Cotransportador KCC2	22
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	25
5. HIPÓTESIS	27
6. OBJETIVOS	28
7. MATERIAL Y MÉTODOS	29
7.1. Diseño de estudio	29
7.2. Manejo de animales	29
7.2.1. Grupos	30

7.2.2. Tipo de alimento	30
7.2.3. Tratamiento nutricional	31
7.2.4. Valoración de la cetosis	31
7.2.5. Cuantificación del peso corporal	31
7.3. Perfusión intracardiaca	32
7.4. Preservación de los cerebros	32
7.5. Selección de los cortes	33
7.6. Inmunohistoquímica	33
7.7. Cuantificación de la densidad óptica (DO) del cotransportador KCC2	34
7.8. Variables	36
7.9. Diseño estadístico	37
8. RESULTADOS	38
8.1. Peso Corporal	38
8.2. Glucosa	40
8.3. β -hidroxibutirato	42
8.4. Peso cerebral	44
8.5. Inmunoreactividad al cotransportador KCC2	45
8.6. Comparaciones entre grupos	48
8.6.1. Capa molecular	48
8.6.2. Capa granular	49
8.6.3. Capa hilar	50
9. DISCUSIÓN	52
10. CONCLUSIONES	61
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
12. ANEXOS	70

1. RESUMEN

La dieta cetogénica se define como una dieta alta en lípidos, baja en hidratos de carbono y adecuada en proteínas, y es uno de los tratamientos no farmacológicos más antiguos utilizado para el control de la epilepsia, sin embargo no se conoce su mecanismo de acción. Por otro lado el cotransportador catión-cloro KCC2 es una proteína de membrana que transporta cloro fuera de las neuronas, regulando así la concentración intracelular de cloro, lo cual determina la fuerza y polaridad de la neurotransmisión mediada por GABA (ácido gamma aminobutírico). Se propone que el mecanismo de acción de la dieta cetogénica, sea a través de los cotransportadores catión-cloro, por lo que el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la dieta cetogénica sobre el cotransportador catión-cloro KCC2 en el giro dentado de la rata. Para esto se utilizaron ratas macho de la cepa Sprague-Dawley divididas al azar en dos grupos, alimentados con una dieta normal ó cetogénica durante tres meses. Al final del experimento se sacrificaron los animales bajo anestesia, se extrajeron los cerebros y se obtuvieron series de cortes coronales de 50 micras, los cuales fueron procesados mediante inmunohistoquímica para KCC2. La expresión de KCC2 se evaluó a través del análisis de la densidad óptica de la inmunoreactividad en las tres capas del giro dentado. Los resultados indicaron un aumento significativo ($p < 0.05$) de la expresión de KCC2 en la capa hilar, en tanto que la expresión en la capa molecular y granular no se vio alterada.

2. INTRODUCCIÓN

La dieta cetogénica (DC) se define como una dieta alta en lípidos, adecuada en proteínas y baja en hidratos de carbono que provoca cetosis, lo que minimiza los potenciales efectos secundarios sobre el crecimiento. En ella, la principal fuente de calorías son las grasas. La razón entre el aporte de grasas y el aporte combinado de proteínas e hidratos de carbono (HC) es de 4:1, aunque en adolescentes o adultos puede requerir una razón de 3:1 o de 2:1 para cubrir las necesidades nutricionales (sobre todo proteicas) propias de cada grupo de edad (Kverneland et al., 2017). La DC es uno de los tratamientos más antiguos en ser utilizado para el manejo de la epilepsia, representa una alternativa terapéutica cuyos orígenes se remontan a casi un siglo (Lambruschini, 2012).

La epilepsia es una clase de enfermedad cerebral crónica común, es un trastorno convulsivo altamente prevalente que tiende a progresar en severidad y se vuelve refractario al tratamiento. Sin embargo, ninguna terapia ha demostrado detener la progresión de la enfermedad o prevenir el desarrollo de la epilepsia (Wu y Liu, 2017). Desafortunadamente aún se desconoce el mecanismo de acción por el cual la DC es eficaz para dicha enfermedad. Sin embargo, se ha postulado que una desregulación de los cotransportadores de cloro: NKCC1 y KCC2, que introducen y extraen cloro de la célula respectivamente, podría ser responsable de la hiperexcitabilidad de las neuronas.

El hipocampo es una zona del cerebro que se ve afectada en algunas enfermedades neurológicas, las tres capas del giro dentado han sido seleccionadas para observar si la DC presenta algún efecto sobre la expresión del

cotransportador KCC2 después de la administración de DC durante 3 meses en un modelo animal.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. Dieta Cetogénica

La DC, es una dieta con alto contenido de grasas, adecuada en proteínas y baja en hidratos de carbono. Esta dieta obliga al cuerpo a usar grasas en lugar de hidratos de carbono como la principal fuente energética. Normalmente, los hidratos de carbono contenidos en los alimentos se convierten en glucosa, que es el sustrato energético principal para el cerebro. Sin embargo, si hay pocos carbohidratos en la dieta, el hígado convertirá la grasa en ácidos grasos y cuerpos cetónicos, estos pasan al cerebro y reemplazan a la glucosa como fuente de energía (Brietzke et al., 2018).

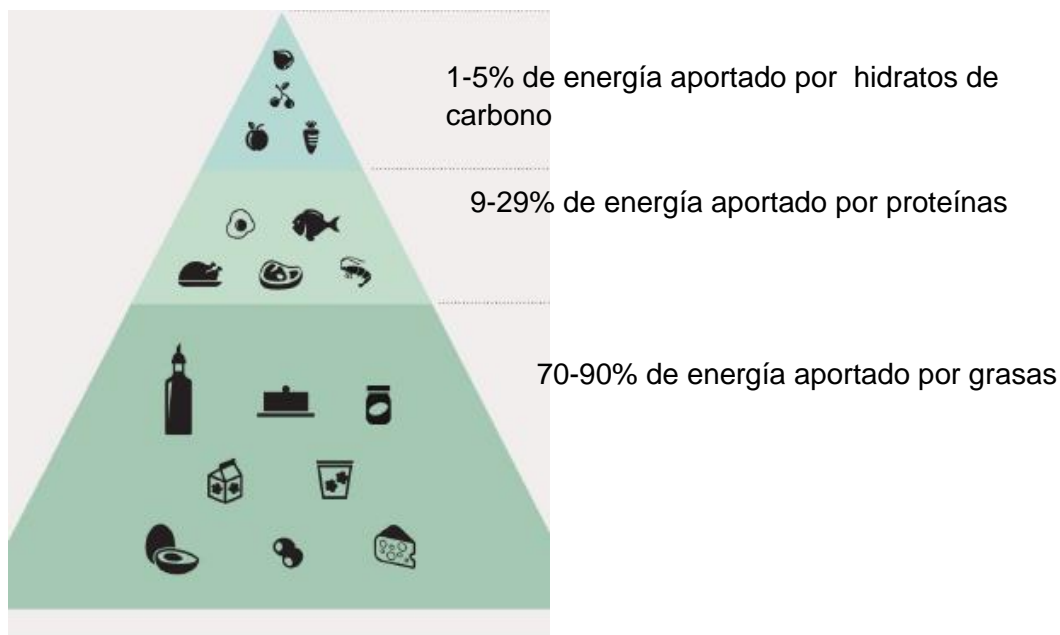


Figura 1. Pirámide de la dieta cetogénica. La pirámide de la dieta cetogénica muestra los principales grupos de alimentos que la constituyen. Los alimentos con grasa aportan la mayor parte de la energía (70-90%). Los alimentos proteicos aportan del 9-29% de la energía, y los carbohidratos solo del 1-5% de energía. Hay diferentes tipos de dietas cetogénicas y los grupos de alimentos varían entre las dietas (Tomado de Kverneland et al., 2017).

3.1.1. Historia de la dieta cetogénica

Existen referencias bíblicas respecto a la utilización del ayuno como tratamiento de un cuadro convulsivo. El primer uso moderno del ayuno como tratamiento de la epilepsia se remonta a 1911; Guelpa y Marie tratan a 20 pacientes en edad infantil y a adultos sin precisar más detalles. Se puede afirmar que el ayuno fue un precursor del empleo de la DC como tratamiento en la epilepsia (Lambruschini, 2012).

En 1921, el Dr. Rawle Geyelin revolucionó la convención anual de la Asociación Médica Americana (AMA) al presentar los casos de varios niños con epilepsia que habían tenido una reducción duradera de sus crisis mediante períodos de ayuno. Russell Wilder, médico de la Clínica Mayo, continuó el trabajo de Geyelin y hacia 1924 había diseñado su “dieta cetogénica”, que imitaba la situación de ayuno a través de una dieta baja en hidratos de carbono y alta en grasas, capaz de ser reproducida en el hogar (Lambruschini, 2012).

Posteriormente el tiempo reveló que tanto la inanición y las dietas con un alto contenido de grasas/baja en hidratos de carbono aumentan los niveles plasmáticos de los cuerpos cetónicos acetoacetato y β -hidroxibutirato. También se propuso que estos productos metabólicos pueden beneficiar a los niños con diversos trastornos neurológicos (Lambruschini, 2012).

En 1928, un estudio de Barborka confirmó la efectividad de la DC para tratar la epilepsia en las convulsiones de adultos, al recibir la dieta completamente controlada, mejorando a 56 de 100 pacientes (Lambruschini, 2012).

Ya se había mencionado a la DC como una herramienta para controlar las crisis epilépticas en muchos textos, pero fue en 1972 cuando Livingston comunicó el

resultado de la dieta administrada a 1,000 niños con epilepsia, comprobando que el 52% de ellos habían obtenido un control completo de las crisis y que en un 27% hubo una gran mejoría.

En 1971, Huttenlocher introdujo los triglicéridos de cadena media (TCM) en la confección de las dietas. Desde 1970 hasta el año 2000 el uso de la DC disminuyó de forma considerable; solo aparecen dos publicaciones por año con esta referencia. Pero la historia cambia cuando, en la NBC-TV's Dateline, Freeman y Kelly, dietista que trabajó con Livingston, tratan con DC a Charlie, un niño de dos años y afecto de unas crisis convulsivas intratables, que mejora rápidamente. A raíz de esto, el padre de Charlie creó la Charlie Foundation. En los últimos años la DC resurgió como tratamiento de la epilepsia refractaria debido a que se demostró mayor efectividad (Lambruschini, 2012).

3.1.2. Indicaciones de la dieta cetogénica

La DC puede ser utilizada en el tratamiento de epilepsias desde edades tempranas (lactancia) hasta la adultez. Atendiendo a la eficacia de la terapia dietaria, Kossoff et al., (2009), sugieren su uso en etapas tempranas de la epilepsia resistente, sobre todo considerando la pobre respuesta a un tercer antiepiléptico en cuadros que no han respondido a bioterapia (Moya, 2016).

Por otro lado, existen variados ensayos clínicos en humanos y animales que plantean un probable (más no demostrado) beneficio de la dieta en enfermedades distintas de la epilepsia. Éstos mencionan condiciones tan diversas como la esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Parkinson y Alzheimer, narcolepsia y traumatismo craneo encefálico (Moya, 2016).

3.1.3. Efectos adversos de la dieta cetogénica

La DC no es un tratamiento inocuo. Dado que se trata de un plan alimentario no balanceado tanto en macro como micronutrientes, puede causar déficits nutricionales en energía, proteínas, minerales y vitaminas (Alberti et al., 2016). Sin embargo, estos efectos no son, generalmente, graves y, en pocos pacientes, es necesaria la interrupción de la dieta. Los efectos adversos informados con mayor frecuencia asociados con el uso de DC en adultos son efectos gastrointestinales, pérdida de peso y un aumento transitorio en los lípidos. Los efectos secundarios gastrointestinales, que incluyen estreñimiento, diarrea, náuseas ocasionales y vómitos, generalmente son leves, y mejoran con el tiempo, la dieta debe ser manejada bajo la guía de un dietista o nutricionista. Comidas más pequeñas, mayor ingesta de fibra, ejercicio, y el aumento de la ingesta de sodio y líquidos a menudo puede prevenir o aliviar estas quejas. La pérdida de peso puede ser una intención de efecto positivo en pacientes con sobrepeso, pero para aquellos que desean mantener o subir de peso, ajustes en la ingesta calórica pueden ser recomendados (McDonald et al., 2017).

El aumento en los lípidos séricos se normaliza con la terapia de dieta continua (después de 1 año) o vuelve a la normalidad después del cese de la terapia de dieta (McDonald et al., 2017).

En un subgrupo más pequeño de pacientes, la deficiencia de selenio puede producir patología cardíaca, y se han detectado otras complicaciones como acidosis tubular renal y pancreatitis. Los niños que reciben terapia dietaria por más de 6 años en forma continua parecen tener el mayor riesgo de litiasis, fracturas y alteraciones del crecimiento (McDonald et al., 2017).

3.1.4. Mecanismo de acción de la dieta cetogénica

El estado celular asociado con las convulsiones aumenta la excitabilidad neuronal que implica un aumento en los potenciales de acción que a su vez son inducidos por la despolarización de la membrana celular en las sinapsis. La polaridad en una sinapsis está regulada por inhibición y neurotransmisores excitadores que controlan bombas de iones y canales que facilitan la afluencia y salida de iones como Na^{2+} , K^+ , Cl^- y Ca^{2+} . En consecuencia, posibles mecanismos anticonvulsivos de la DC están vinculados a cambios en las cantidades de neurotransmisores, así como los cambios que influyen en la polaridad de la membrana neuronal. El principal neurotransmisor excitador glutamato puede ser sintetizado a partir del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Youngson et al., 2017).

El glutamato puede convertirse en el principal neurotransmisor inhibitorio del ácido gamma-aminobutírico (GABA), o ser transaminado a aspartato. Como se requiere oxaloacetato para la generación de energía, hay un relativo aumento en la cantidad de glutamato que se convierte en GABA. Algunos estudios en humanos y ratas apoyan este mecanismo anticonvulsivo mostrando que una DC conduce a un aumento de GABA y reduce el glutamato en el cerebro. Otro jugador potencial es el neurotransmisor inhibitorio neuropéptido Y (NPY) que sería aumentado por cetogénesis o inanición, y se sabe que es antiepiléptico. El aumento en la generación de ATP por la DC proporciona un terreno amplio para explicar las teorías de los efectos anticonvulsivos como una multitud de procesos celulares que requieren ATP. Este último y el metabolismo energético están íntimamente

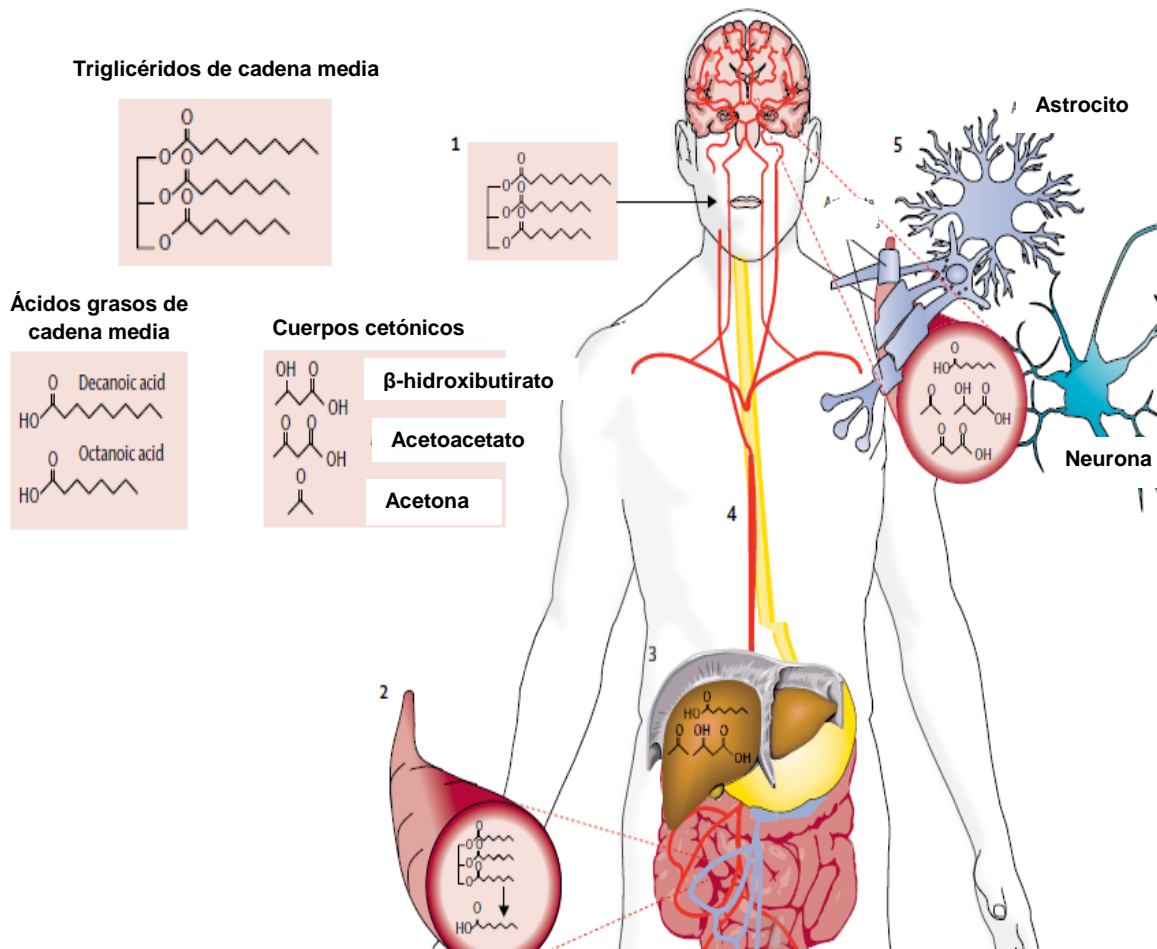


Figura 2. Desglose y circulación de los triglicéridos de cadena media en la dieta cetogénica: (1) Los triglicéridos de cadena media (que contienen ácido decanoico y ácido octanoico) se consumen como parte de la dieta cetogénica de triglicéridos de cadena media. (2) Los ácidos grasos (ácido decanoico y ácido octanoico) se liberan de los triglicéridos en el intestino y luego se transfieren al hígado, donde (3) la mayoría de estos ácidos grasos de cadena media se descomponen en tres cuerpos cetónicos (β -hidroxibutirato, acetoacetato y acetona). (4) Tanto los ácidos grasos libres como las cetonas son transportados al cerebro a través de la circulación sanguínea. (5) Los ácidos grasos y las cetonas se transportan a través de la barrera hematoencefálica, donde están disponibles como fuente de energía a las células del cerebro (Augustin et al., 2018).

conectados a otro proceso a través del cual la DC es antiepiléptico proporcionando neuroprotección. Se proponen mecanismos neuroprotectores para ambos, al aumentar el umbral de las crisis y reduciendo el daño al cerebro que se genera por las convulsiones (Youngson et al., 2017).

3.1.5. Tipos de dietas

3.1.5.1. Dieta cetogénica clásica

La forma convencional o clásica de la DC: consiste en proporcionar el 90% de las calorías como grasas y el 10% restante como proteínas e hidratos de carbono complejos (CHO), estableciendo una relación entre lípidos, proteínas e CHO, de 4:1 o de 3:1. Se ha demostrado que la dieta con la relación 4:1 es más efectiva que la 3:1, ya que pacientes con dieta 3:1 aumentaron su control de crisis cuando fueron cambiados a una dieta 4:1. El otro tipo de DC es la que utiliza los triglicéridos de cadena media (TCM), proporcionando el 30% de proteínas y de CHO y el 70% de grasas, de igual forma la dieta de Atkins puede ser utilizada para tratamientos contra la epilepsia (Cornejo, 2010).

3.1.5.2. Dieta de Atkins

La dieta Atkins fue creada en los años setenta por el Dr. Robert Atkins para el tratamiento de la obesidad, está basada en la restricción de hidratos de carbono, pero no de las proteínas ni del aporte calórico. La dieta modificada de Atkins restringe el aporte de glucosa a 10 g al día en niños y a 15 g en adultos. Esta dieta es una alternativa dietaria terapéutica en el tratamiento de la epilepsia fármaco-resistente, la cual consiste en una dieta con un aporte de 60% de grasas, 30% de proteínas y 10% de carbohidratos (Vaccarezza et al., 2014).

3.1.5.3. Dieta de Triglicéridos de cadena media

Los triglicéridos de cadena media (TCM) son un tipo de lípido cuyas moléculas de ácido graso tienen entre 6 y 12 átomos de carbono. Los TCM forman parte de muchos alimentos. Su consumo es considerado totalmente seguro y presenta como únicos posibles efectos adversos a destacar las náuseas, malestar gástrico

y diarreas. Los TCM, en comparación con los triglicéridos de cadena larga (TCL), producen un mayor efecto saciante, conducen a un mayor gasto energético y son capaces de reducir tanto el número de adipocitos como el tamaño de los mismos. Todo esto trae como consecuencia una menor ganancia de peso y un descenso en los depósitos grasos. El consumo de TCM en una dieta cetogénica permite aumentar los valores de hidratos de carbono ingeridos en hasta un 20% de las calorías totales, sin que el paciente salga de su estado de cetosis (Pérez-Guisado, 2010).

3.2. Sistema nervioso central

El sistema nervioso es una red compleja de estructuras especializadas (encéfalo, médula espinal y nervios) que tienen como misión controlar y regular el funcionamiento de los diversos órganos y sistemas, coordinando su interrelación y la relación del organismo con el medio externo. El sistema nervioso está organizado para detectar cambios en el medio interno y externo, evaluar esta información y responder a través de ocasionar cambios en músculos o glándulas. El Sistema nervioso se divide en sistema nervioso central y periférico; el primero situado en el cráneo y la columna por lo cual está formado por el encéfalo y la médula espinal; el segundo, el sistema nervioso periférico, se localiza fuera del cráneo y la columna, aquí se incluyen ganglios nerviosos, terminaciones nerviosas y órganos sensoriales (Tortosa y Reiriz, 2018).

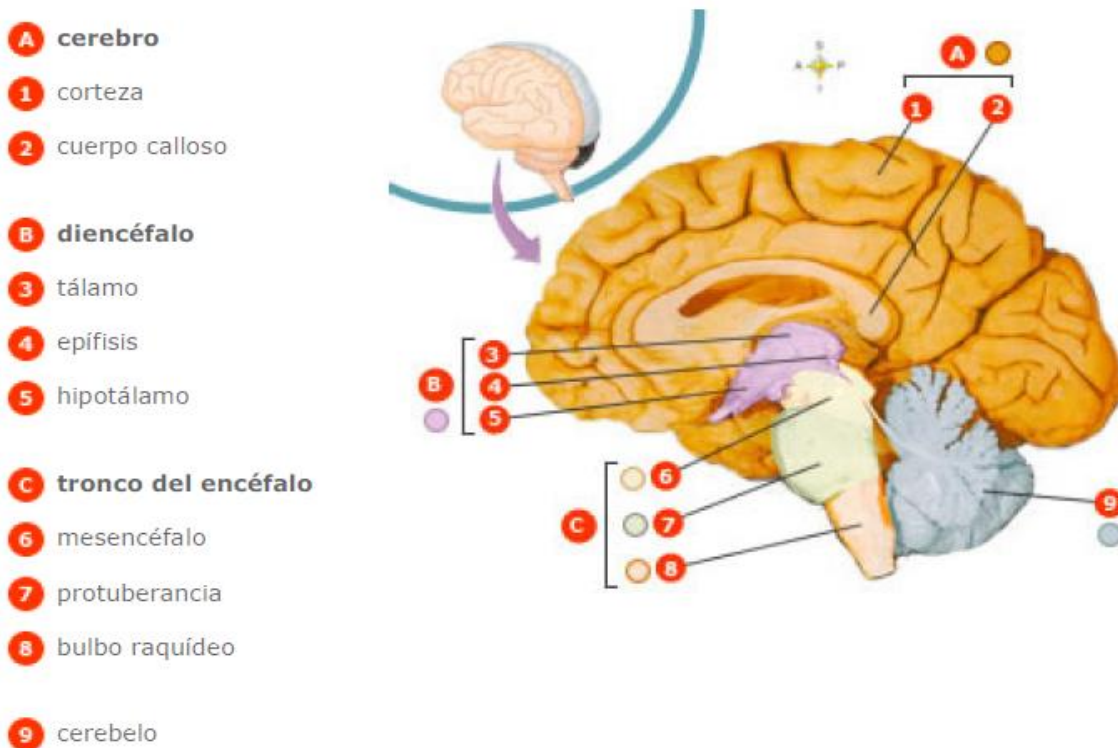


Figura 3. Partes del Sistema nervioso central. El encéfalo consta de cuatro partes principales: el tronco del encéfalo, el cerebelo, el diencefalo y el cerebro. El tronco del encéfalo consta de tres partes: el bulbo raquídeo, la protuberancia y el mesencéfalo (Thibodeau y Patton, 2007).

3.2.1. Neuronas

Las neuronas son células especializadas en recibir, conducir y transmitir señales electroquímicas. El encéfalo humano contiene alrededor de 100,000 millones de neuronas. Un modo de clasificar las neuronas se basa en la cantidad de procesos (es decir, proyecciones o prolongaciones) que surgen de su cuerpo celular, así tenemos a las neuronas que tienen más de dos procesos se denomina neurona multipolar; la mayoría de las neuronas son multipolares, una neurona con un proceso se denomina neurona unipolar, y una neurona con dos procesos se clasifica como neurona bipolar. Las neuronas con axones cortos, o sin axón, se llaman interneuronas; su función consiste en integrar la actividad neural que

ocurre dentro de una única estructura cerebral, no en transmitir señales de una estructura a otra (Nieuwenhuys, 2009).

Las neuronas no son las únicas células que se encuentran en el sistema nervioso; las otras se llaman neuroglíocitos o células gliales. Estas últimas superan en número a las neuronas en una proporción de diez a uno. Existen cuatro tipos de células gliales: los oligodendrocitos emiten prolongaciones que se enrollan en torno a los axones de algunas de las neuronas del sistema nervioso central, estas prolongaciones son ricas en mielina, una sustancia grasa aislante; y la vaina de mielina que aumenta la velocidad y eficacia de la conducción axónica. Una función similar es llevada a cabo por el segundo tipo de células gliales en el sistema nervioso periférico las células de schwann. Un tercer tipo de neuroglíocitos son los astrocitos, son los más grandes de los neuroglíocitos y se les llama así porque tienen forma de estrella. Las prolongaciones con forma de brazos de algunos astrocitos recubren la superficie de los vasos sanguíneos que recorren el cerebro y también establecen contacto con los cuerpos celulares de las neuronas. Estos astrocitos específicos intervienen en el paso de sustancias químicas desde la sangre a las neuronas del SNC. Un cuarto tipo de neuroglíocitos son los microglíocitos, estos responden a las lesiones o a las enfermedades absorbiendo los desechos celulares y desencadenando las respuestas inflamatorias (Nieuwenhuys, 2009).

Las neuronas presentan una sorprendente diversidad de formas y tamaños, pero muchas son similares (Figura 4) (Nieuwenhuys, 2009).

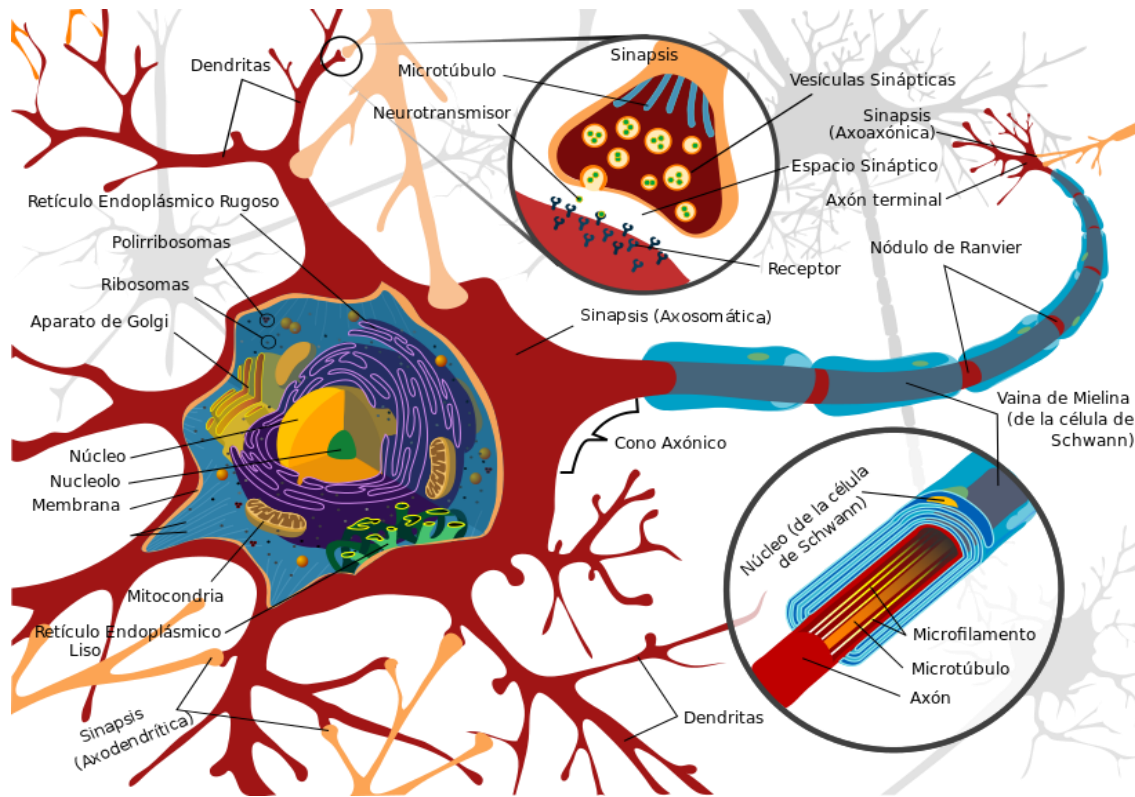


Figura 4. Partes de la Neurona. Las neuronas están formadas por un cuerpo o soma donde se localiza el núcleo de la célula, de igual forma contiene dendritas y axones los cuales permiten realizar diferentes tipos de sinapsis, por ejemplo: axosomática, axoaxónica y axodendrítica (tomado de: <https://es.wikipedia.org/wiki/Neurona>, WIKIMEDIA COMMONS, 2018).

El cuerpo o soma neuronal contiene el núcleo y el citoplasma, con todos sus orgánulos intracelulares, rodeado por la membrana plasmática. Las dendritas son prolongaciones cortas ramificadas, en general múltiples, a través de las cuales la neurona recibe estímulos procedentes de neuronas vecinas con las cuales establece una sinapsis o contacto entre células (Lee et al., 2012).

3.3. Formación Hipocámpica

La Formación hipocámpica, mejor conocida como hipocampo deriva de la región medial del telencéfalo, forma parte del sistema límbico y tiene un papel importante

en la adquisición del aprendizaje espacial y la consolidación de la memoria a largo y corto plazo. Anatómicamente en los humanos está organizado en el cuerno de Amón (hipocampo propio) y el giro dentado (separados por la fisura hipocampal); el complejo subicular, formado por el presubiculum, el subiculum y el parasubiculum; y la corteza entorrinal. El cuerno de Amón está dividido en tres áreas: CA1, CA2 y CA3 (Olivares et al., 2015).

En el ratón adulto el hipocampo es una estructura allocortical compleja con forma cilíndrica y organizada en capas. Su extremo anterior, también llamado polo septal, se localiza dorsalmente en el cerebro y es contiguo a su homólogo contralateral. Situándose justo detrás de la región septal, encima del tálamo dorsal y por debajo del cuerpo calloso, el extremo anterior del hipocampo está bordeado dorsal y lateralmente por el córtex parietal. Desde ahí, el hipocampo se curva tanto ventralmente como lateralmente hacia el extremo posterior, también llamado polo temporal. Este extremo está separado anatómicamente de su homólogo contralateral, se extiende hasta el área amigdaloides localizada ventrolateralmente y está más o menos limitado dorsolateralmente por parte de la corteza occipital, temporal y perirrinal y, más centralmente, por la corteza entorrinal (Figura 5) (Cassel et al., 1997).

La formación hipocámpica está formada por el conjunto de tres estructuras arquicorticales (es decir, una corteza organizada en tres capas): el subiculum, el asta de Amón y el Giro Dentado o fascia dentada (fascia dentata). Se habla de un hipocampo propiamente dicho (*hippocampus proper*) cuando se hace referencia a los cuatro campos del asta de Amón en los que se identifica más claramente una organización en cuatro regiones CA1, CA2, CA3 y CA4 (Cassel et al., 1997).

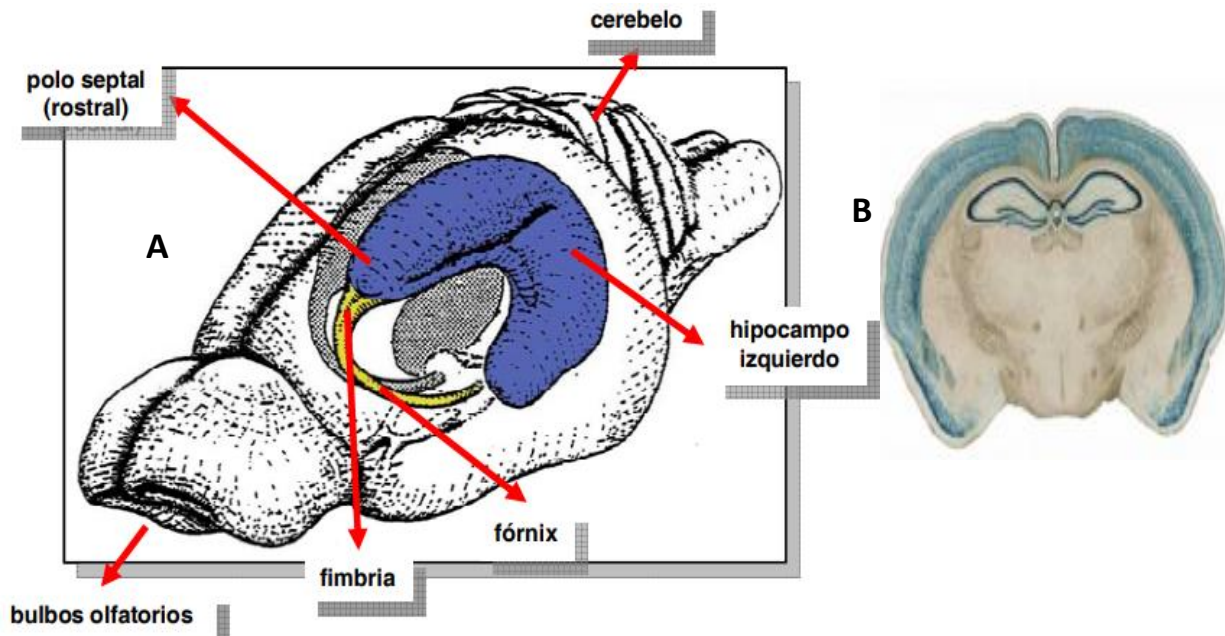


Figura 5. Representación tridimensional del hipocampo de ratón. A) En color azul se muestra la posición del hipocampo en el cerebro de ratón, forma una estructura alargada y arqueada en forma de C, con su eje mayor septotemporal extendiéndose desde los núcleos septales, rostralmente, hasta la corteza temporal, ventrocaudalmente. En amarillo aparece el principal sistema de fibras aferentes y eferentes de la formación hipocampal, la fimbria y el fórnix (Adaptado de O'Mara et al. , 2001), **B)** Hipocampo de ratón adulto, teñido con la técnica de Nissl (azul de toluidina). Se pueden ver las dos áreas en las que se organiza el Hipocampo la Fascia dentada (DG), el cual presenta, en la rata una característica forma de "v"; y el Asta de Ammon (CA), el cual, a su vez, se subdivide en cuatro zonas CA1, CA2, CA3 y CA4, y que además se imbrica con la Fascia Dentada a nivel de la CA4. También se pueden ver zonas adyacentes al Hipocampo como el Subiculum (Rodríguez, 2015).

La zona más distal, designada CA1, se caracteriza por estar formada por células piramidales pequeñas, mientras la zona más proximal, formada por la CA2 y CA3, es rica en células piramidales de mayor tamaño. Las distintas áreas están estratificadas. Así, en la capa más interna encontramos un estrato rico en fibras, el *alveus* o sustancia blanca. Luego, encontramos una capa estrecha, el *stratum oriens* (Or), formada esencialmente por las dendritas basales de las células piramidales, que conforman el *stratum pyramidale*, de naturaleza glutamatérgica. A continuación, encontramos el *stratum radiatum*, formado por las dendritas apicales

de las neuronas piramidales. En la parte más exterior (cercana a la fisura hipocámpica) encontramos el *stratum lacunosum moleculare*, que contiene las ramificaciones más distales de las dendritas apicales de las neuronas piramidales. Únicamente en el área CA3, entre los *stratums piramidale* y *radiatum*, es posible encontrar un estrecho estrato acelular, formado por las dendritas apicales de las piramidales de CA3 y en el cuál se establecen conexiones con las fibras musgosas procedentes del giro dentado, el *stratum lucidum*. El giro dentado está formado por una capa de somas pequeños densamente empaquetados en columnas (*stratum granulare*), donde residen las células granulares. Estas neuronas son de naturaleza glutamatérgica y poseen axones basales denominados fibras musgosas. En la capa más cercana a la fisura hipocámpica *stratum moleculare* o capa molecular, se localizan las prolongaciones dendríticas apicales de las neuronas granulares, algunas interneuronas y células gliales. La capa más profunda del giro dentado, designada *hilus* o capa hilar, se caracteriza por su naturaleza polimórfica, compuesta por una gran variedad de tipos celulares. Entre el *stratum granulare* y el *hilus* se pueda distinguir una fina capa, la capa subgranular, compuesta por precursores neurales que poseen actividad neurogénica durante la vida adulta (Cassel et al., 1997; Rodríguez, 2015).

3.4. Epilepsia

La epilepsia es uno de los trastornos más frecuentes en neurología, es definida como un desorden cerebral caracterizado por una predisposición duradera a generar convulsiones epilépticas asociadas a consecuencias neurobiológicas,

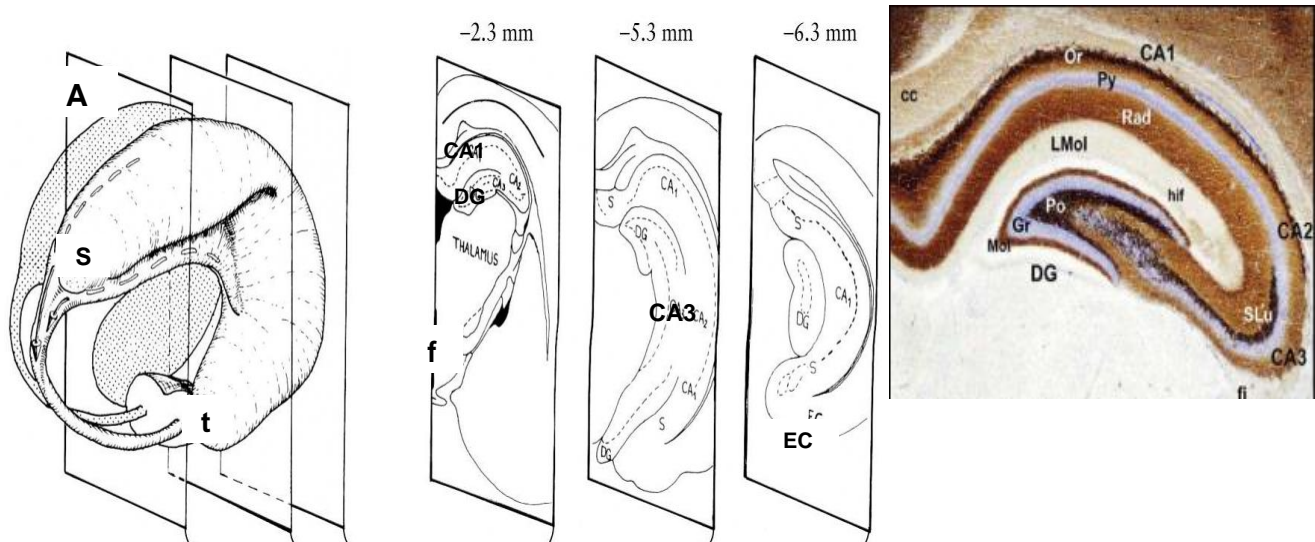


Figura 6 (A). Diagrama del giro dentado del hipocampo de rata. A) Se muestran tres secciones coronales a través del hipocampo izquierdo en la parte derecha de la figura, con sus coordenadas **S** teroposterior aproximada en relación con bregma. CA1, CA3: campos de *Cornu Ammonis* 1–3; **DG**: giro dentado; EC: corteza entorrinal; S: subículo; t: polo temporal del hipocampo (Cheung y Cardenal, 2005). **(B)** Microfotografía de una sección cerebral coronal del hipocampo de ratón, tenido por la doble tinción de Timm-Nissl. En las regiones CA1-CA3 se identifican una serie de estratos celulares y fibrosos: oriens (Or), piramidal (Py), radiatum (Rad) y *lacunosum moleculare* (LMol). Únicamente, en la región CA3, hay otra capa denominada *stratum lucidum* (SLu). En el giro dentado, justo por debajo de la fisura hipocámpica (hif), vemos la capa molecular (Mol), y hacia el interior la capa de células granulares (Gr), seguida de la capa polimorfa (Po), o hilar. fi, fimbria; cc, corpus callosum (Rodríguez, 2015).

cognitivas, psicológicas y sociales. Se considera que una persona tiene epilepsia cuando presenta estos episodios no originados por alteraciones médicas identificadas como: convulsiones febriles, abstinencia al alcohol u otras drogas, alteraciones metabólicas, entre otras (Castaño et al., 2016).

La epilepsia se manifiesta como la presentación crónica y recurrente de fenómenos paroxísticos (crisis o ataques) ocasionados por descargas neuronales desordenadas y excesivas que se originan en el cerebro, tienen causas diversas y manifestaciones clínicas variadas (Mellado y Núñez, 2016).

Se estima que en el mundo hay 50 millones de personas con epilepsia, 80 % de ellas viven en países pobres y de estos, unos ocho millones están en

Latinoamérica y el Caribe. Cerca del 3 % de la población tendrá diagnóstico de epilepsia en algún momento de su vida. Son reportadas prevalencias de 5.7 a 6.8 y de 4.0 por cada mil habitantes para Estados Unidos y el Reino Unido, respectivamente (Castaño et al., 2016). En México, estudios epidemiológicos han encontrado tasas de prevalencia e incidencia similares a las de otros países en vías de desarrollo, con un número total de sujetos que oscila entre 1.5 y 2 millones (Shkurovich y Collado, 2017).

La Liga Internacional contra la Epilepsia (ILAE) es el principal organismo científico del mundo dedicado al estudio de la epilepsia. La definición oficial de convulsión es una aparición transitoria de signos y / o síntomas debido a una actividad neuronal anormal, excesiva o sincrónica en el cerebro. Esto significa que, durante una convulsión, un gran número de células cerebrales se activan anormalmente al mismo tiempo (Fisher et al., 2017).

3.4.1. Epilepsia refractaria

La Liga internacional contra la epilepsia (ILAE, por sus siglas en inglés: International League Against Epilepsy) define a la epilepsia refractaria como aquella en la cual se ha producido el fracaso a 2 ensayos de fármacos antiepilépticos, en monoterapia o en combinación, tolerados, apropiadamente elegidos y empleados de forma adecuada, para conseguir la ausencia mantenida de crisis. Se considera ausencia mantenida de crisis un periodo de un año o, en caso de crisis muy esporádicas, un periodo de al menos el triple al mayor intervalo intercrisis pretratamiento, escogiéndose el que sea mayor de ellos (López et al., 2015).

3.5. Neurotransmisores

Un neurotransmisor (NT) es una sustancia química liberada selectivamente de una terminación nerviosa por un potencial de acción, que interacciona con un receptor específico en una estructura adyacente y que, si se recibe en cantidad suficiente, produce una determinada respuesta fisiológica. Para constituir un NT, una sustancia química debe estar presente en la terminación nerviosa, ser liberada por un potencial de acción y, cuando se une al receptor, producir siempre el mismo efecto. Existen muchas moléculas que actúan como NTs y se conocen al menos 18 NTs mayores, varios de los cuales actúan de formas ligeramente distintas. Los aminoácidos glutamato y aspartato son los principales NTs excitadores del sistema nervioso central (Brady, 1991).

3.5.1. Ácido gamma-aminobutírico

El ácido gamma-aminobutírico (GABA) es el principal NT inhibitorio cerebral. Deriva del ácido glutámico, mediante la descarboxilación realizada por la glutamato-descarboxilasa. Se metaboliza a semialdehído succínico, el cual es regenerado a ácido glutámico. Se libera por medio de un canal dependiente de calcio en las terminaciones nerviosas. Es recaptado por un sistema de transporte en él que se ha detectado un componente de alta afinidad y uno de baja afinidad. Se han encontrado, dos tipos de transportadores: el GAT-A, que actúa en neuronas y la glía, y el GAT-B, que solo actúa en neuronas tras la interacción con los receptores específicos, el GABA es recaptado activamente por la terminación y metabolizado, además se encuentra ampliamente distribuido (Brady, 1991). Regula los sistemas estimuladores del cerebro; cualquier cambio en la activación de éste tendrá su

efecto en aquellos. Su desbalance puede asociarse a cuadros como la depresión; su adecuado balance constituye la base de importantes acciones farmacológicas (Valverde, 2008).

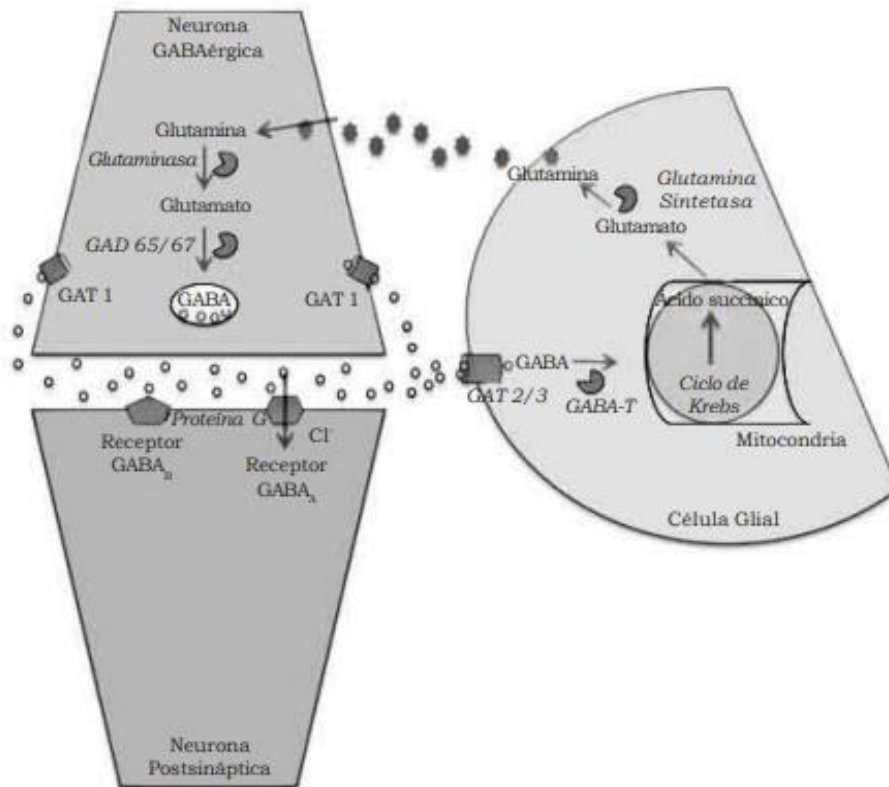


Figura 7. Sinapsis GABAérgica. La síntesis de GABA se inicia por la descarboxilación de glutamato por la glutamato descarboxilasa (GAD); se empaqueta en vesículas luego de una entrada de Ca⁺⁺ y después se libera el contenido en la hendidura sináptica para luego unirse a receptores ionotrópicos (GABA_A) y receptores metabotrópicos (GABA_B). Luego de su unión a receptores, el GABA puede recaptarse por la glia o interneuronas y de nuevo se convierte a glutamato (Cuauhtémoc et al., 2013).

El receptor GABA_A es una estructura compleja que incluye al receptor GABAérgico propiamente dicho, al receptor endógeno de las benzodiazepinas y el canal iónico que, como neurotransmisor inhibitorio, es un canal de cloro (Cl⁻), así como la GABA-modulina, una proteína de enlace entre las estructuras principales, es decir,

entre el receptor GABA y el receptor benzodiazepínico. La GABA-modulina bloquea inicialmente a los receptores e inhibe el canal iónico de Cl⁻; cuando esta proteína deja de actuar, ambos receptores se complementan abriendo el canal del Cl. El receptor GABA_B es un heterodímero (B1 y B2) que inhibe adenilciclase, y a través de esta a varios sistemas efectores que inhiben la entrada de Ca₂⁺ y facilitan la salida de K⁺ (Valverde, 2008).

3.6. Cotransportadores

Los cotransportadores electroneutros de K⁺:Cl son importantes proteínas de la membrana plasmática involucradas en muchos procesos fisiológicos como la secreción renal de potasio (K⁺), la pérdida de K⁺ durante la isquemia al miocardio, el transporte transepitelial de sal, la homeostasis del cloro intraneuronal y la regulación del volumen celular. Debido a estas funciones esenciales, mutaciones en estos transportadores están asociadas con una variedad de desórdenes como sordera, hipertensión, disfunción renal, convulsiones, dolor crónico e inclusive, en ciertos casos (como la delección total del gen), llegan a ser incompatibles con la vida (Mercado y Melo., 2014).

En el genoma de los mamíferos estas proteínas son codificadas por la familia SLC12/CCC de nueve miembros, de los cuales siete de ellos son transportadores acoplados a cloro. La primera incluye aquellas proteínas que transportan sodio acoplado a cloro dentro de la célula: dos cotransportadores de Na⁺:K⁺:2Cl⁻ (SLC12A1/ NKCC2 y SLC12A2/NKCC1) y el cotransportador de Na⁺:Cl⁻ (SLC12A3/NCC) con una identidad entre sí de ~50%. La segunda rama incluye a los KCCs que transportan potasio acoplado a cloro fuera de la célula y son ampliamente expresados en el organismo. Los genes que codifican para estas

proteínas se denominan SLC12A4-A7 correspondientes a las isoformas conocidas como KCC1-4, respectivamente y comparten 65% de identidad. Entre las conclusiones generales se ha reportado que el cotransportador de K⁺:Cl⁻ es un sistema de transporte activo secundario que es electroneutro, de localización ubicua e involucrado en la regulación del volumen celular, activado por hinchamiento, acidificación ligera y la presencia de inhibidores de proteínas cinasas; mientras que la reducción del volumen celular, la acidificación marcada y la presencia de inhibidores de proteínas fosfatasas, reducen su actividad. Otra característica interesante de los KCCs es su capacidad de transportar NH₄⁺ en lugar de K⁺, lo que sugiere un papel importante en la regulación del pH intracelular (Mercado y Melo., 2014).

3.6.1. Cotransportador KCC2

El gen que codifica para KCC2 genera, mediante el uso de promotores alternativos y primeros exones, dos isoformas denominadas KCC2a y KCC2b. Ambas isoformas difieren en la presencia de una secuencia única de 40 residuos de aminoácidos en el extremo amino terminal de KCC2a que incluye un probable sitio de unión a la cinasa SPAK (Ste20-type kinases). Se demostró también que su expresión estaba restringida a neuronas, incluyendo las neuronas piramidales del hipocampo y las células granulares, entre otras. La cinética del transporte de iones

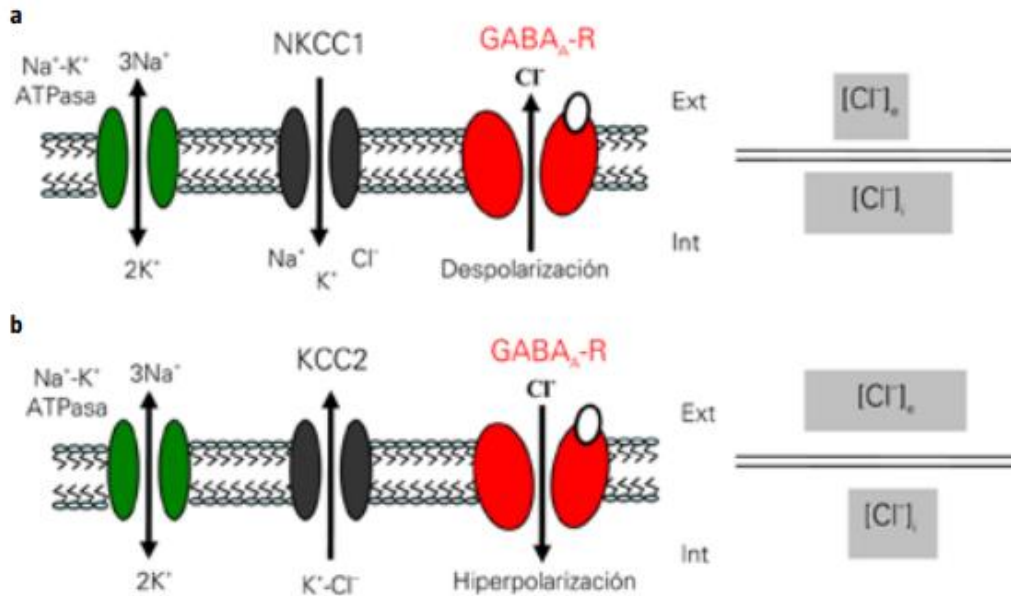


Figura 8. Cotransportadores catión-cloro NKCC1 y KCC2. a) En neuronas inmaduras, NKCC1 mueve cloro al interior celular utilizando el gradiente de sodio establecido previamente por la bomba sodio-potasio ATPasa. Tras la activación del receptor GABA por su ligando, la salida del cloro a través del canal-receptor favorece la despolarización de la membrana; b) Durante la vida posnatal, la alta expresión de KCC2 sustituye a la de NKCC1; consecuentemente, la concentración de cloro extracelular es mayor con respecto al interior de la célula. Bajo estas condiciones, la transmisión Gabérgica cambia de excitadora a inhibitoria (Cortes et al., 2011).

para esta isoforma reveló que la afinidad por el K^+ extracelular era significativamente mayor que por el Cl^- extracelular y se propuso que KCC2 podría funcionar como una vía de influjo y eflujo, manteniendo baja la concentración de cloro intraneuronal y de este modo, regulando el tipo de respuesta a ciertos neurotransmisores tales como el GABA y la glicina. También el KCC2 participa en la re-captura del K^+ que sale de la célula durante la actividad neuronal. Cuando la salida del K^+ aumenta, debido a una gran actividad neuronal o durante procesos patológicos tales como crisis epilépticas, isquemia o hipoxia, el incremento en la concentración de K^+ extracelular promueve la entrada de K^+ por el cotransportador y previene la inhibición post-sináptica de GABA a través del influjo

de Cl⁻. Entre algunas de las características que diferencian a las isoformas KCC2 de los demás KCCs, es la capacidad única de KCC2 de mediar un transporte constitutivo de K⁺:Cl⁻ en condiciones isotónicas; mientras que los otros tres KCCs son activados exclusivamente por aumento de volumen celular. Otra característica estructural exclusiva de KCC2 es la presencia de una secuencia de ~100 residuos de aminoácidos, ricos en prolina, serina y residuos cargados hacia el final de la región carboxilo terminal (Mercado y Melo., 2014).

Es bien sabido que KCC2 es una proteína implicada en definir la concentración intracelular de cloro en diversas neuronas; a mayor actividad de KCC2, menor la concentración de cloro intraneuronal. El gradiente de cloro creado por KCC2 produce hiperpolarización de la membrana celular promoviendo que GABA actúe como un estímulo inhibitorio. En el caso de que KCC2 no esté activo o ausente, la concentración intraneuronal de cloro aumenta, produciendo despolarización de la membrana y promoviendo que GABA actúe como un estímulo excitador e inhibitorio (Valverde, 2008; Mercado y Melo, 2014).

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La incidencia de pacientes con epilepsia refractaria a medicamentos es elevada, y muchos de estos pacientes no son candidatos a la cirugía de epilepsia o se niegan a la intervención quirúrgica, por lo que es necesario evaluar otras alternativas terapéuticas no farmacológicas o quirúrgicas, como la dieta cetogénica.

Si bien se desconoce el mecanismo de acción de la dieta cetogénica, se ha demostrado clínicamente que disminuye las crisis no solo durante su uso sino meses después de su interrupción tanto en humanos como en modelos experimentales, disminuyendo el riesgo a desarrollar crisis epilépticas. Se ha reportado la formación de cuerpos cetónicos (cetosis) por el consumo de la dieta cetogénica, estos cuerpos cetónicos son utilizados como metabolitos alternos por el cerebro, los cuales a su vez podrían interactuar con las células, aumentando así la inhibición neuronal, además se ha demostrado que el β -hidroxibutirato, al ser el cuerpo cetónico producido en mayor cantidad, reduce la acción despolarizante del GABA mediante la inducción de hiperpolarización GABAérgica en neuronas neocorticales durante el desarrollo posnatal *in vitro*. Sin embargo, otros estudios demostraron que los cuerpos cetónicos no modifican la actividad del cotransportador KCC2. Un estudio previo de nuestro grupo de investigación (Gómez-Lira et al., 2011) demostró por medio de un análisis estereológico, que la administración a corto plazo de la dieta cetogénica a un grupo de ratas sanas, no modificó la expresión de los cotransportadores NKCC1 y KCC2 en el hipocampo y giro dentado. Debido a esto es necesario prolongar el uso de la dieta cetogénica en un modelo animal, para evaluar si los resultados obtenidos son debidos al tiempo de administración y si se presentan alteraciones diferenciales en la

expresión del cotransportador por estrato del giro dentado, estructura cerebral altamente susceptible a las crisis epilépticas.

5. HIPÓTESIS

Hipótesis Alterna

La dieta cetogénica proporcionada por tres meses aumenta la expresión (densidad óptica) del cotransportador KCC2 en las tres capas del giro dentado de la rata con respecto a las ratas control.

Hipótesis Nula

La dieta cetogénica proporcionada por tres meses no aumenta la expresión (densidad óptica) del cotransportador KCC2 en las tres capas del giro dentado de la rata con respecto a las ratas control.

6. OBJETIVOS

Objetivo General

Estudiar el efecto de la dieta cetogénica sobre la expresión del cotransportador catión-cloro KCC2 en el giro dentado de la rata.

Objetivos particulares

Cuantificar en ratas alimentadas con dieta normal y cetogénica:

- Peso corporal
- Peso cerebral
- Concentración de glucosa en sangre periférica
- Concentración de β -hidroxibutirato en sangre periférica
- Densidad óptica de la inmunodetección al cotransportador KCC2 en las tres capas del giro dentado: molecular, granular e hilar

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1. Diseño de estudio:

Tipo de estudio de acuerdo a:

- El estudio es prospectivo ya que toda la información se recabó de acuerdo con los criterios del investigador y para los fines específicos de la investigación, después de la planeación de ésta.
- La evolución del fenómeno estudiado, es longitudinal ya que las variables: peso corporal de las ratas, concentración de glucosa y β -hidroxibutirato, se midieron más de una vez a lo largo del experimento. Transversal, ya que el número de células inmunoreactivas a KCC2 de las capas del giro dentado solo se midió una vez.
- La comparación de las poblaciones, el estudio es comparativo debido a que las variables se cotejaron entre los grupos.
- La participación del investigador en el fenómeno que se analiza, el estudio es experimental por que la variable tipo de dieta se modificó a voluntad.
- El control de las variables, el estudio es experimental debido a que se tiene una hipótesis de trabajo y se tienen dos grupos control y experimental (Arias, 2001).

7.2. Manejo de Animales:

Se utilizaron 12 ratas macho, albinas de la cepa Sprague-Dawley de 21 días de edad recién destetadas y separadas en pares para mantener interacción social; se mantuvieron en jaulas de polisulfonato para rata 259 mm x 476 mm x 209 mm; tapadas con una rejilla de acero inoxidable con división para bebedero y comedero. Las jaulas se colocaron en estantes metálicos ubicados en el interior del Bioterio del Instituto Nacional de Pediatría, manteniéndose bajo idénticas condiciones de luz-oscuridad de 12 horas cada una, a temperatura de 22-24 °C, humedad relativa 40-50% de acuerdo a la Norma oficial Mexicana NOM-062-ZOO-

1999. El recambio y limpieza de las jaulas, comederos y bebederos, se llevó a cabo cada tercer día hasta que concluyó el experimento.

7.2.1. Grupos:

Se formaron dos grupos de animales:

- 1) Grupo control (DN). Ratas alimentadas con una dieta normal (n= 6).
- 2) Grupo experimental (DC). Ratas alimentadas con dieta cetogénica (n= 6).

Para evitar problemas en el desarrollo del sistema nervioso y modificación de la expresión del cotransportador de estudio KCC2, las ratas se mantuvieron en parejas, debido a que el aislamiento es una condición muy usada en modelos de esquizofrenia y estrés, además, los procesos de desarrollo neuronal en la corteza cerebral de los roedores y el humano son similares en términos neurobiológicos.

7.2.2. Tipo de alimento

Se utilizaron dos tipos de alimento:

- a) Dieta Normal (DN): dieta 2018S de Harlan Teklad. USA con proteínas al 18%. Es una fórmula fija, esterilizable por calor húmedo, diseñada para apoyar la gestación, la lactancia y el crecimiento de roedores. La presentación del alimento es en pellets o croquetas.
- b) Dieta cetogénica (DC): dieta 96355 de Harlan Teklad, USA. Es una dieta alta en grasas, baja en hidratos de carbono. La proporción de grasa con proteína más carbohidratos en la dieta cetogénica es de aproximadamente 4.25. Su consistencia es parecida a la de una pasta color beige.

7.2.3. Tratamiento nutricional

De acuerdo a un estudio piloto realizado en el laboratorio donde se llevó a cabo este experimento, (datos no publicados) y artículos como el de Cárdenas-Villalvazo et al., (2010), en donde se evaluó la cantidad de dieta consumida con respecto al aislamiento de las ratas, se demostró que no hay diferencia significativa entre el consumo promedio de ratas aisladas y ratas mantenidas en un ámbito social a partir del momento del destete. Sin embargo para evitar alteraciones cerebrales que puedan modificar los resultados, se decidió dejar a las ratas en parejas.

Una vez destetadas y separadas en parejas, el grupo control inicio su alimentación con una dieta normal, y el grupo experimental se mantuvo en ayuno (sin alimento) por 24 horas, con el fin de alcanzar más rápidamente un estado de cetosis. Inmediatamente después se inició su alimentación con la DC. Todos los animales tuvieron libre acceso a las respectivas dietas y al agua durante 93 o 94 días (114 días de edad), según al grupo al que pertenecían.

7.2.4. Valoración de la cetosis

Se obtuvieron mediciones basales (al destete) y finales (el día del sacrificio) de la concentración de glucosa y β -hidroxibutirato. Para esto se realizó un pequeño corte en la punta de la cola, limpiando las primeras gotas de sangre, con la ayuda de un glucómetro marca Abbott modelo OptiumXceed y tiras reactivas FreeStyle para glucosa y para cetonas de la misma marca se tomaron muestras de sangre periférica y se midieron las concentraciones de glucosa y β -hidroxibutirato.

7.2.5. Cuantificación del peso corporal

Se registró el peso corporal al momento del destete y al día del sacrificio de las ratas, se pesaron en una balanza granataria para animales.

7.3. Perfusión intracardiaca

Al final del experimento los animales se sacrificaron. Primero se anestesiaron por vía intraperitoneal, con dosis de pentobarbital sódico (Anestosal, Pisabental, Pisa-México, 2017) (140 mg /kg). Una vez que la rata estuvo completamente anestesiada se procedió a la perfusión que consistió en realizar una incisión en el tórax para colocar una cánula en el ventrículo izquierdo, bloquear las arterias y cortar la aurícula derecha para drenar la sangre y que las soluciones se introdujeran. Con la ayuda de una bomba para infusión se dejó pasar inicialmente solución salina al 0.9% para lavar y posteriormente una solución fijadora de paraformaldehído (Electron Microscopy Sciences, USA, 2017) al 4% en buffer de fosfatos 0.1 M pH 7.4, hasta que el cuello y cabeza de la rata estuvieran rígidos y su nariz y ojos pálidos, se decapitó a las ratas con una guillotina y se extrajeron los cerebros quitando cuidadosamente el cráneo con la ayuda de tijeras y gubia.

7.4. Preservación de los cerebros

Una vez extraído el cerebro, se pesó y almacenó en paraformaldehído al 4% en buffer de fosfatos 0.1 M pH 7.4 durante 24 horas en refrigeración para post-fijar el tejido. Posteriormente se colocaron en soluciones graduales de sacarosa (Sigma, USA, 2017) al 10%, 20% y 30% en buffer de fosfatos 0.1 M pH 7.4, y permanecieron ahí hasta que el tejido bajo al fondo del vial contenedor. A continuación, se congeló el cerebro sumergiéndolo en 2-metilbutano (Sigma-Aldrich, USA, 2016) enfriado con hielo seco, posteriormente se almacenaran en un ultracongelador (Thermo Fisher Scientific, USA, 2009) a -80° C hasta su uso. En

un criostato (Leica, Alemania, 1995) se realizaron cortes seriados por congelación en un plano coronal, con grosor de 50 micras y se recolectaron en cajas de 24 pozos que contenían solución crioprotectora o anticongelante (50% Buffer de fosfatos 0.1 M pH 7.4, 25% de glicerol (Sigma, USA, 2017) y 25% de etilenglicol, (Sigma, USA, 2015)). Los cortes que contenían el hipocampo se almacenaron a -20°C.

7.5. Selección de los cortes

Se seleccionaron sistemáticamente y al azar los cortes para cada rata que se procesaron posteriormente por inmunohistoquímica. De los primeros ocho cortes se seleccionó un corte de inicio al azar, a partir de este se seleccionó cada octavo corte hasta terminar el tejido que contenía el hipocampo. Finalmente se seleccionaron de 12 a 14 cortes por animal.

7.6. Inmunohistoquímica

La inmunodetección se realizó en microplacas para cultivo de 24 pozos. Se empleó un agitador orbital programado a 30 rpm. Se utilizaron controles negativos (sin anticuerpo primario o secundario) a la tinción. Después de varias estandarizaciones, los cortes se procesaron con el siguiente procedimiento de inmunodetección para KCC2 a temperatura ambiente y agitación constante:

- Incubación en una solución de peróxido de hidrógeno al 3% (Baker, USA, 2016).
- Incubación en una solución 20X Inmuno DNA Retriever Citrate (Bio SB, USA, 2016) en estufa a 65° C
- Tres lavados de 15 minutos con buffer de fosfatos 0.1 M pH 7.4

- Incubar con el anticuerpo primario de conejo KCC2 con dilución 1:1500 (Millipore, USA, 2017), diluido en suero de caballo (Hyclone, USA, 2017) al 5%, Triton X100 (Spectrum, USA, 2015) al 0.3% y PB 0.1 M, a pH 7.4 durante toda la noche.
- Incubar en el anticuerpo secundario de cabra, biotinilado IgG anti conejo con dilución 1:500 (Vector-Laboratories, USA, 2017) diluido en suero de caballo al 5%, Triton X100 al 0.3% y PB 0.1 M, pH 7.4, durante dos horas
- Tres lavados de 10 minutos cada uno con buffer de fosfatos (PB) 0.1 M pH 7.4.
- Para evidenciar la reacción los cortes se incubaron en la solución de diaminobenzidina (DAB) (Vector-Laboratories, USA, 2017) por 3 minutos, pasado este tiempo se paró la reacción con agua destilada.
- Tres lavados de 10 minutos cada uno con buffer de fosfatos (PB) 0.1 M pH 7.4.
- Montar el tejido en portaobjetos gelatinizados, previamente etiquetados y deje secar usando el medio de montaje entellan (Merck, Alemania, 2011), colocando un cubreobjetos.

7.7. Cuantificación de la densidad óptica (DO) del cotransportador KCC2

La expresión del cotransportador KCC2 en los cortes de los diferentes animales se llevó a cabo obteniendo la densidad óptica de la marca. Primero se utilizó un sistema de análisis de imágenes digitalizado que consiste en un microscopio BX-51 (Olympus, USA, 2007) de campo claro con platina motorizada en tres ejes (x,y,z) y el software Stereo investigator (Microbrightfield, USA, 2007). Se tomaron imágenes o fotografías por separado de cada hemisferio del hipocampo (izquierdo

HI y derecho HD) en la serie de cortes de cada animal, estandarizando y manteniendo las condiciones de luz, objetivo de 20X, apertura del condensador, filtros, balance de blancos obteniendo imágenes en 2D. El segundo paso fue procesar estas imágenes con el programa Imagej v1-52e (NIH, USA), las imágenes se cambiaron en formato RGB de 8 bits esto ayudo a medir un balance de grises (densitometría) con un rango de (0 a 255 siendo 0 negro y 255 blanco). Se trazó el contorno de las tres capas del giro dentado: molecular, granular e hilar, para cada hemisferio del hipocampo, posteriormente se obtuvo la densidad óptica de cada capa del giro dentado de cada hemisferio, también se obtuvo la densidad óptica total de cada capa (densidad óptica del HD y HI). Los resultados se expresaron en unidades arbitrarias.

El análisis morfométrico de la densidad óptica para KCC2 se llevó a cabo de acuerdo a las siguientes unidades de análisis:

1) Por capa del Giro dentado:

- a) Capa molecular
- b) Capa granular
- c) Capa hilar

2) Por lateralidad o hemisferio:

- a) Hemisferio derecho
- b) Hemisferio izquierdo
- c) Ambos hemisferios o total

Finalmente se obtuvo la densidad óptica para KCC2 en las siguientes zonas de análisis:

A) Capa molecular:

- a) Hemisferio derecho de la capa molecular
- b) Hemisferio izquierdo de la capa molecular
- c) Ambos hemisferios

- B) *Capa granular*
- Hemisferio derecho de la capa granular
 - Hemisferio izquierdo de la capa granular
 - Ambos hemisferios
- C) *Capa hilar*
- Hemisferio derecho de la capa hilar
 - Hemisferio izquierdo de la capa hilar
 - Ambos hemisferios

Se realizaron dos tipos de análisis estadísticos:

- 1) Entre grupos: comparaciones de cada zona entre el grupo DN y el grupo DC.
- 2) Intra grupo: comparaciones entre las diferentes zonas de análisis en un mismo grupo (DN ó DC).

7.8. Variables

Independiente

- Tipo de dieta: cualitativa, nominal, categórica

Dependiente

- Peso corporal (g): cuantitativa, continua.
- Concentración de β -hidroxibutirato: (mmol/L) en sangre periférica: cuantitativa, continua.
- Concentración de glucosa en sangre periférica (mg/dL): cuantitativa, continua.
- Peso cerebral (g): cuantitativa, continua.
- Densidad óptica del cotransportadorKCC2: cuantitativa, discreta.
- Área de las capas del giro dentado μm^2 : cuantitativa, continua.

7.9. Diseño estadístico

Los datos obtenidos se ordenaron en una base de datos en Excel, para el análisis estadístico se utilizó el Paquete Estadístico para las Ciencias Sociales, SPSS

versión 25, los valores se expresaron como promedio y desviaciones estándar, se realizarán cuadros y gráficas con los datos obtenidos para demostrar las diferencias o similitudes entre los grupos según el valor de significancia de $p \leq 0.05$ para todos los análisis. Se llevaron a cabo dos tipos de análisis.

1) Entre grupos:

Se realizaron comparaciones para cada uno de los parámetros entre el grupo DN y DC, tanto al inicio y final del experimento. Para este caso se aplicaron las pruebas estadísticas t de Student ó U Mann Whitney para datos de dos muestras independientes, según la homocedasticidad de los datos. Las variables analizadas fueron: peso corporal al inicio del experimento, peso corporal al final del experimento, niveles de glucosa al inicio del experimento, niveles de glucosa al final del experimento, concentración de β -hidroxibutirato al inicio y final del experimento, peso cerebral, cuantificación de densidad óptica para el cotransportador KCC2 de cada una de las tres capas del giro dentado.

2) Intra grupos:

Las comparaciones se realizaron entre los datos obtenidos al inicio del experimento con los datos obtenidos al final del experimento por grupo (DN ó DC). Para estos casos se aplicó la prueba t de Student para muestras relacionadas. Las variables analizadas fueron: peso corporal, glucosa y β -hidroxibutirato, comparándose al inicio y final del experimento.

8. RESULTADOS

Para analizar el efecto de las dietas normal y cetogénica, se evaluaron los siguientes parámetros: peso corporal, concentración de glucosa y β -hidroxibutirato en sangre periférica, tanto al inicio (destete) como al final (sacrificio) de la ingesta de las dietas, además del peso cerebral que se evaluó solo al final del experimento.

8.1. Peso corporal

Al inicio del experimento, los valores promedio del peso corporal \pm la desviación estándar para el grupo DN fueron de 47.23 g \pm 2.42 g y para el grupo DC de 50.28 g \pm 9.0 g. Al final del experimento, los valores promedio del peso corporal \pm la desviación estándar para el grupo DN fueron de 478.20 g \pm 65.26 g y para el grupo DC de 467.25 g \pm 68.68 g. Los datos fueron comparados con la prueba estadística t de Student para muestras independientes. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo alimentado con dieta normal y dieta cetogénica, ni al inicio ni al final de la administración de las dietas (figura 9, anexo 5). Al realizar las comparaciones en cada grupo con la prueba estadística t de Student para muestras relacionadas entre el inicio y el final del experimento, se observó que existen diferencias estadísticamente significativas, las cuales corresponden al aumento de peso en el tiempo de 1012.4% para el grupo DN y de 929.2% para el grupo DC (figura 9, anexo 5).

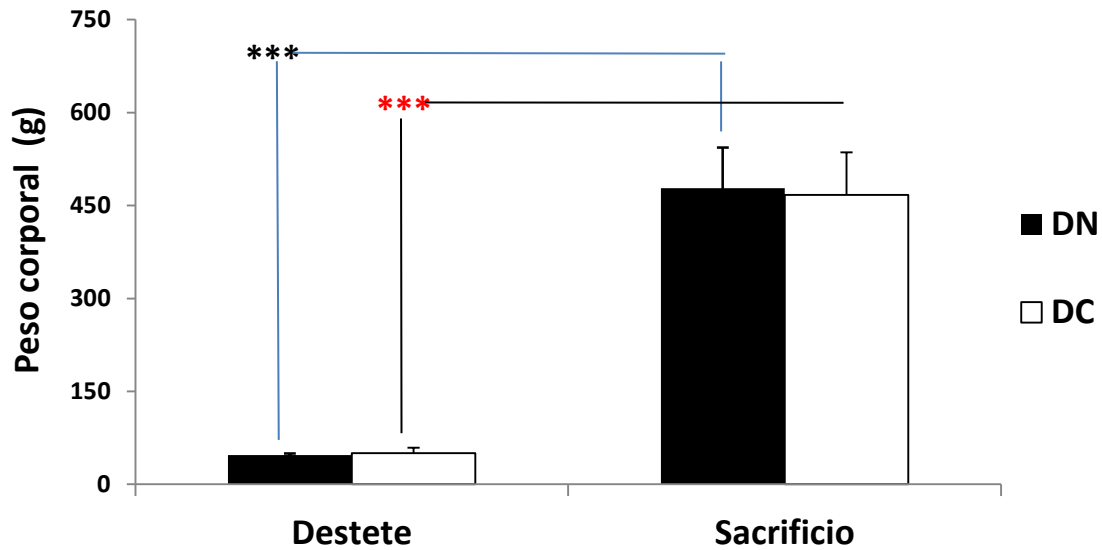


Figura 9. Efecto de la dieta cetogénica sobre el peso corporal. Gráfica del peso corporal de los grupos dieta normal (DN) y dieta cetogénica (DC) al inicio y final del experimento. No existieron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos DN y DC ni al inicio ni al final del experimento. En la comparación por edad, el grupo de DN mostro un peso corporal significativamente mayor al final del experimento (***) respecto del inicio de la administración de la dieta, de igual forma en el grupo de DC (***) $p \leq 0.001$.



Figura 10. Rata del grupo dieta cetogénica (DC) al destete o inicio del experimento. Se observa rata del grupo DC al destete momento en el que se inició el experimento (21 días posnatales). En el piso de la caja del grupo DC se colocó una rejilla de metal para evitar el contacto directo de los animales con el aserrín y las heces. La dieta cetogénica es en pasta, por lo que se colocó en recipientes.

8.2. Glucosa

Los valores promedio \pm la desviación estándar de la concentración de glucosa en sangre periférica al inicio del experimento fueron de 132.25 mg/dL \pm 13.02 mg/dL para el grupo de DN, y para el grupo DC de 134.57 mg/dL \pm 12.32 mg/dL, en tanto que al final del mismo fueron de 92 mg/dL \pm 7.23 mg/dL para el grupo DN y 89.57 mg/dL \pm 12.93 mg/dL para el grupo DC (figura 11).

Después de comparar éstos datos con la prueba estadística t de Student para muestras independientes, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo DN y DC ni al inicio ni al final de experimento. Para la comparación por edad se aplicó la prueba estadística t de Student para muestras relacionadas, observándose diferencias estadísticamente significativas en el grupo DN y DC. Así, las concentraciones de glucosa en sangre periférica fueron significativamente menores al final de la administración de las dietas que al inicio del experimento, tanto para el grupo DN (30.44%) como para el grupo DC (33.44%), (figura 11, anexo 6).

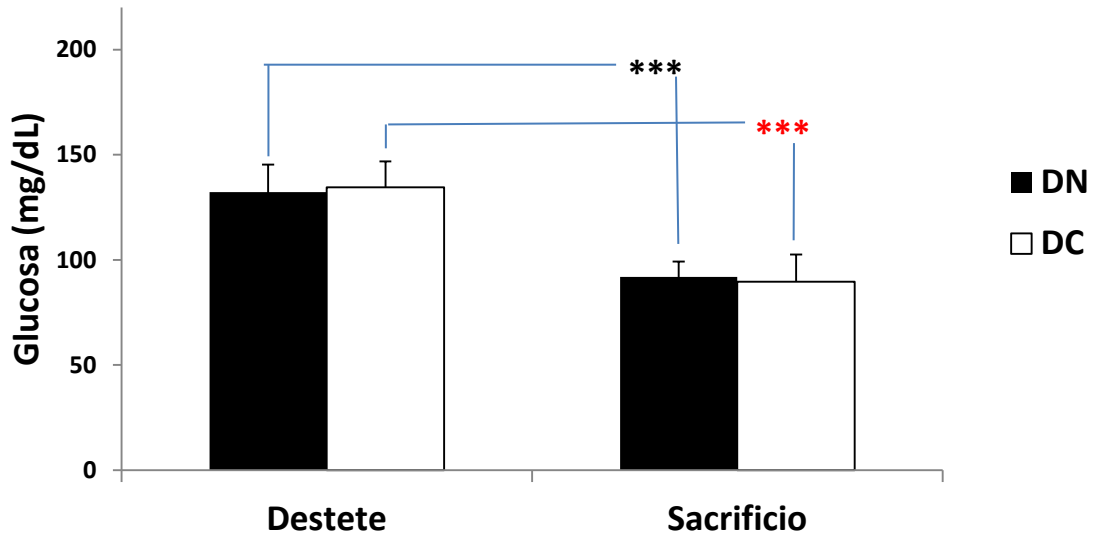


Figura 11. Efecto de la dieta cetogénica sobre la concentración de la glucosa sanguínea periférica. Grafica de los niveles de glucosa en sangre periférica del grupo de dieta normal (DN) y dieta cetogénica (DC) al inicio y final del experimento. No existieron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos DN y DC ni al inicio ni al final del experimento. En la comparación por edad, el nivel de glucosa para los dos grupos DN (***) y DC (***) al final del experimento fue significativamente menor que al inicio.



Figura 12. Glucómetro con una lectura de glucosa en sangre periférica al inicio o destete, de un animal alimentado con dieta normal.

8.3. β -hidroxibutirato

Los valores promedio \pm la desviación estándar de la concentración de β -hidroxibutirato en sangre periférica al inicio del experimento fueron de 1.1 mmol/L \pm 0.30 mmol/L para el grupo DN y de 1.17 mmol/L \pm 0.43 mmol/L para el grupo DC. Al final del experimento fueron de 0.25 mmol/L \pm 0.08 mmol/L para el grupo DN y 1.37 mmol/L \pm 0.36 mmol/L para el grupo DC.

La comparación entre grupos con la prueba estadística t de Student para muestras independientes mostró que al inicio del experimento no existieron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de β -hidroxibutirato entre los grupos DN y DC. Sin embargo al final del experimento el grupo DC mostró un aumento estadísticamente significativo (448%) del nivel de β -hidroxibutirato en sangre periférica respecto del grupo DN (figura 13, anexo 7).

Las comparaciones por edad con la prueba t de Student para muestras relacionadas indicaron que en el grupo DN los niveles en sangre de β -hidroxibutirato son significativamente menores (77.27 %) al final del experimento. Por otro lado el grupo DC no mostró diferencias estadísticamente significativas en éste parámetro al final del experimento respecto del inicio (figura 13, anexo 7).

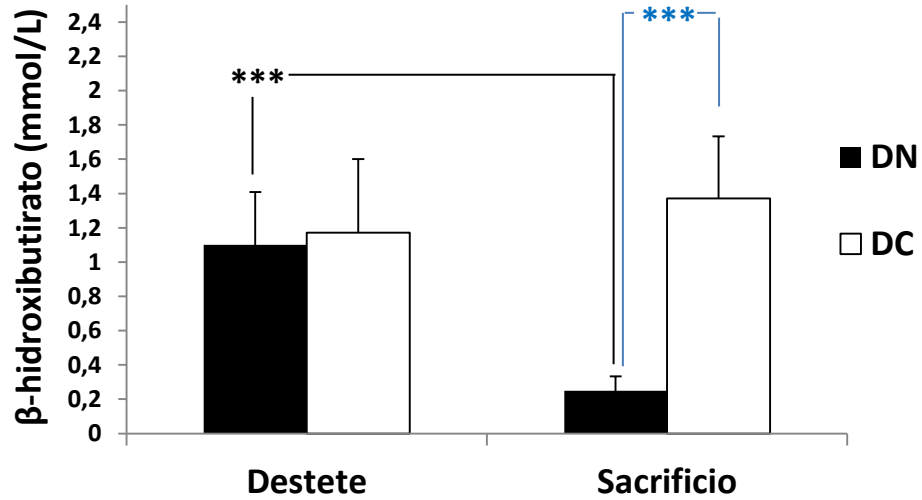


Figura 13. Efecto de la dieta cetogénica sobre la concentración del β -hidroxibutirato en sangre periférica. Gráfica de la concentración de β -hidroxibutirato en sangre periférica en los grupos de dieta normal (DN) y de dieta cetogénica (DC) al inicio y final del experimento. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos DC y DN al final del experimento (***) . En la comparación por edad solo existieron diferencias significativas en el grupo DN (***) .

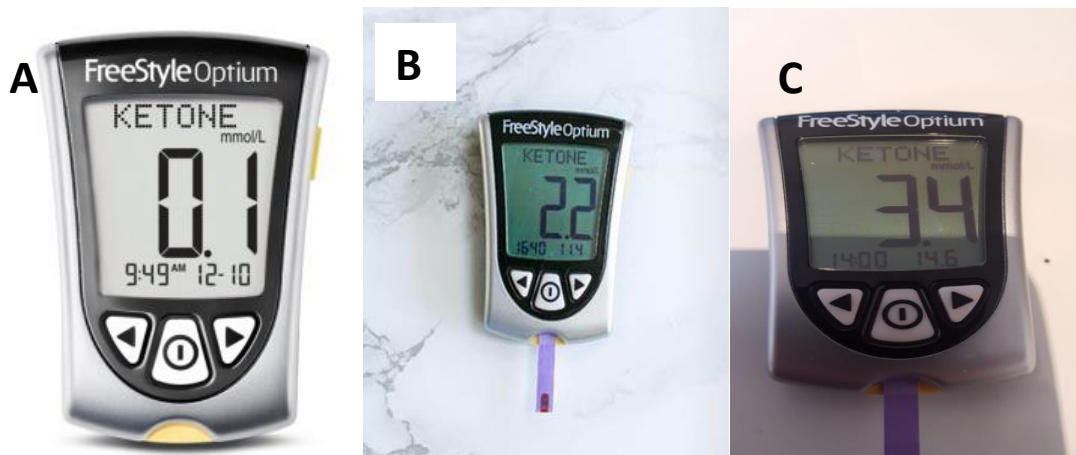


Figura 14. Mediciones de β -hidroxibutirato en sangre periférica. De izquierda a derecha: A, muestra los niveles de β -hidroxibutirato al inicio del experimento, B y C, glucómetro con tira reactiva que cuantifica la concentración de β -hidroxibutirato en el grupo DC al final del experimento.

8.4. Peso cerebral

Las mediciones promedio \pm la desviación estándar para el peso cerebral al final del experimento para el grupo DN fueron de $1.813 \text{ g} \pm 0.118 \text{ g}$ y para el grupo DC $1.878 \text{ g} \pm 0.095 \text{ g}$, al comparar los datos con la prueba t de Student para muestras independientes no se presentaron diferencias estadísticamente significativas (figura 15, anexo 8).

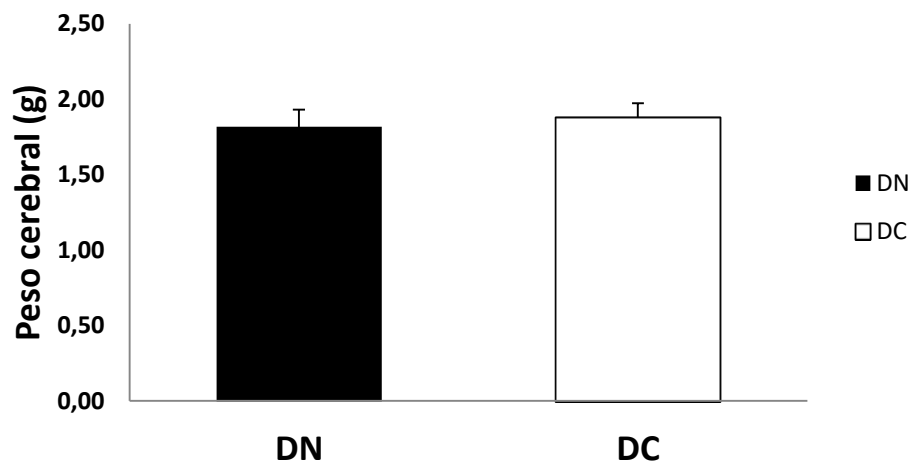


Figura 15. Efecto de la dieta cetogénica sobre el peso cerebral. Grafica del peso cerebral de los grupos alimentados con dieta normal (DN) y dieta cetogénica (DC) al final del experimento. No existieron diferencias estadísticamente significativas en el peso cerebral.

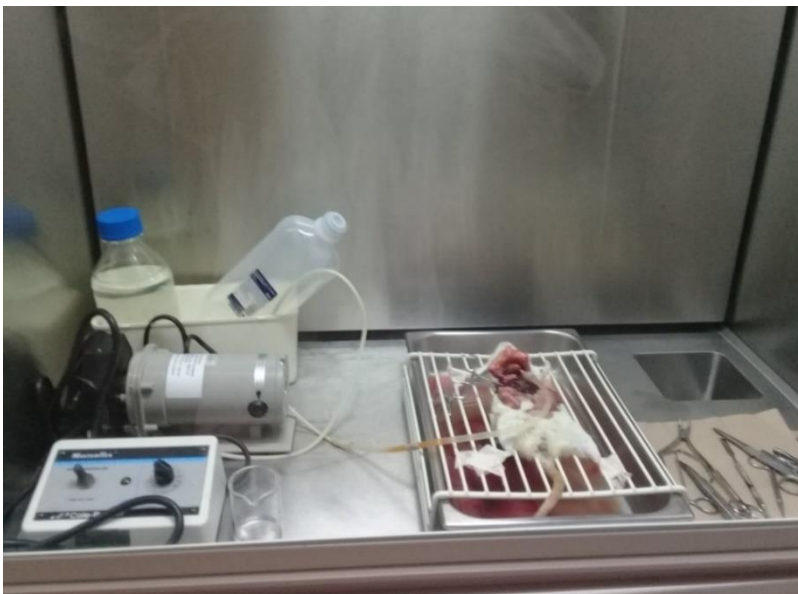


Figura 16. Perfusión intracardiaca. Vía de perfusión que introduce al sistema circulatorio de la rata, solución salina al 0.9% y paraformaldehído al 4%. El fijador entra a través del ventrículo izquierdo, pasa a la aorta, y desde aquí se distribuye por todo el cuerpo. Posteriormente el fijador circula a los vasos venosos y estos terminan por vaciar su contenido en la aurícula derecha, donde se realiza un corte para que drene la solución fijadora fuera del cuerpo del animal.

8.5. Inmunoreactividad al cotransportador KCC2

Haciendo referencia al análisis cualitativo de la inmunoreactividad en imágenes del hipocampo y giro dentado en cortes procesados por la técnica de inmunodetección para el cotransportador KCC2 en el grupo de DN, (figura 17) se observó que el hipocampo y el giro dentado no se ven modificados en su morfología, conservando adecuadamente la laminación propia del giro dentado y del hipocampo lo cual se observó en ambos hemisferios. Estas características morfológicas también se conservaron en el grupo de DC.

Con respecto al patrón de tinción se observó que las tres capas del giro dentado presentaron una inmunoreacción difusa, al igual que en el resto del hipocampo, lo cual permitió identificar y delimitar cada una de las regiones de análisis: capa molecular, granular e hilar del giro dentado (figura 18).

Se observó mayor inmunoreactividad en la capa molecular en comparación con las demás capas, debido a que la tinción en esta fue más oscura, esto se deduce ya que la inmunoreactividad del cotransportador se analizó obteniendo la densidad óptica de cada uno de los cortes tratados, la cual se determinó dando valores de 0 a 255 donde el valor más cercano a cero es de color negro y con mayor reactividad y el más alejado es de color blanco con menor reactividad. Recordemos que en la capa molecular se encuentran principalmente las dendritas de las células granulares, pero también se encuentran axones y neuronas. Para el caso de la capa granular la tinción es más tenue en comparación con la capa molecular, por último la capa hilar presenta una tinción difusa y más cercana al color blanco lo que indica menor inmunoreactividad del cotransportador KCC2, en esta capa se tiñen diversos procesos neuronales (axones y dendritas) (figura 19).



Figura 17. Serie de cortes coronales. Serie de cortes coronales procesados con la técnica de inmunohistoquímica para KCC2 de una rata del grupo DN. Los cortes se seleccionaron de una manera al azar y sistemáticamente y se emplearon para determinar la densidad óptica de KCC2. Barra de calibración = 1000 mm.



Figura 18. Imagen de un corte del GD. Se observa un corte medial del GD a mayor aumento de una rata del grupo DN procesado con inmunohistoquímica para KCC2. Se muestran las capas donde se llevó a cabo la medición de la densidad óptica para este cotransportador: capa molecular (cm), capa granular (cg) y capa hilar (ch). Barra de calibración = 250 μ m.

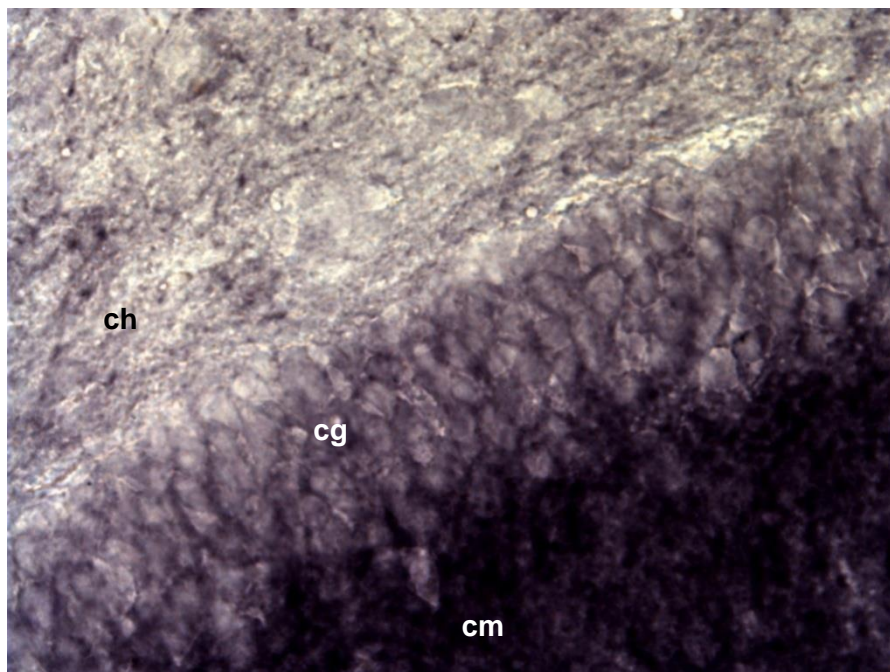


Figura 19. Detalle de las capas. Se muestra una ampliación del corte anterior para mostrar con detalle cada una de las capas del GD: capa hilar (ch), capa granular (cg) y capa molecular (cm). Como puede observarse la capa molecular presenta la mayor densidad óptica o marca para el KCC2, en tanto que la capa hilar presenta la menor densidad óptica para KCC2. En la capa granular la marca se encuentra alrededor de las células granulares en la membrana plasmática formando un halo alrededor de éstas. Barra de calibración = 20 μ m.

Cuando se analizó el patrón de tinción a mayor aumento se observó principalmente en la capa granular, que la inmunoreactividad del contrantransportador KCC2 se presentaba alrededor de los somas neuronales es decir en la membrana plasmática, no se tiñeron los somas de las células granulares, la coloración de la tinción oscilo entre el color negro y diferentes tonos de grises (figura 19).

8.6. Comparaciones entre grupos (DN vs DC)

8.6.1. Capa molecular

En el grupo DN los valores promedio \pm la desviación estándar de la densidad óptica para KCC2 en la capa molecular por hemisferio fue de 30.68 ± 5.27 para el hemisferio derecho, para el hemisferio izquierdo fue de 36.61 ± 12.00 , y en ambos hemisferios de 33.64 ± 8.46 . Para el grupo DC el promedio \pm la desviación estándar en el hemisferio derecho fue de 37.92 ± 6.21 , en el hemisferio izquierdo 42.68 ± 6.93 , y en ambos hemisferios fue de 40.30 ± 6.31 . Para la comparación de los valores se utilizó la prueba estadística t de Student para muestras independientes, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el hemisferio derecho del grupo DN y el hemisferio derecho del grupo DC, tampoco en la comparación entre el hemisferio izquierdo del grupo DN y el hemisferio izquierdo del grupo DC. De igual manera no existieron diferencias significativas entre el total de ambos hemisferios del Grupo DN y DC (figura 20, anexo 9).

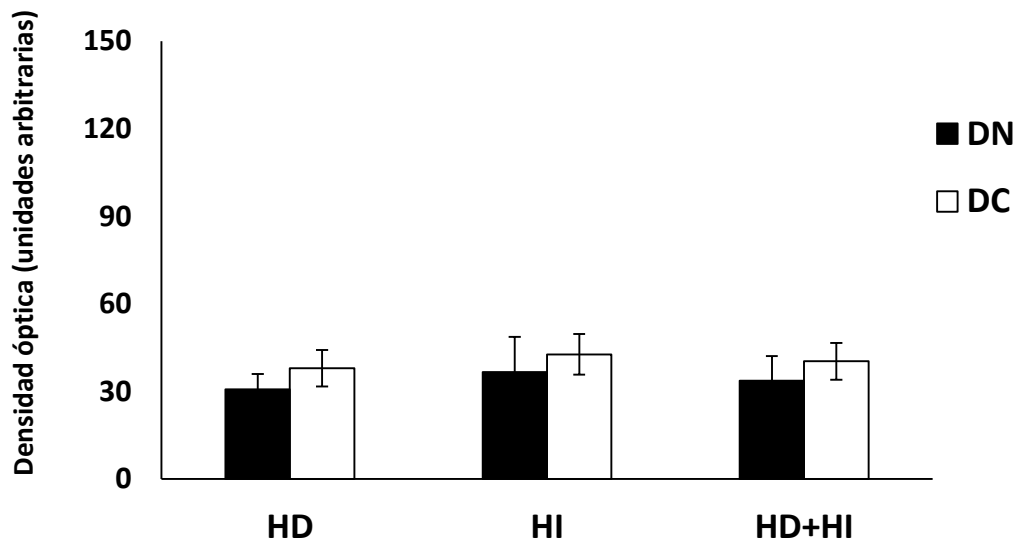


Figura 20: Gráfica de la densidad óptica de la capa molecular por hemisferios. Expresión del cotransportador KCC2 por densidad óptica de la capa molecular en los hemisferio derecho (HD), izquierdo (HI) y en ambos hemisferios (HD+HI) del grupo de dieta normal (DN) y cetogénica (DC). No existieron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los casos analizados.

8.6.2. Capa granular

En el grupo DN los valores promedio \pm la desviación estándar para la expresión del cotransportador KCC2 por densidad óptica en la capa granular por hemisferio fue de 45.65 ± 6.31 para el hemisferio derecho, en el hemisferio izquierdo de 59.83 ± 11.76 , y en ambos hemisferios de 52.74 ± 8.99 . En el grupo de DC los valores promedio \pm la desviación estándar de la densidad óptica en unidades arbitrarias para el hemisferio derecho fue de 52.66 ± 7.81 , en el hemisferio izquierdo de 62.88 ± 10.15 , y en ambos hemisferios los valores son de 57.77 ± 8.54 .

Al realizar la prueba estadística t de Student para muestras independientes para comparar los hemisferios derechos o izquierdo entre el grupo DN y DC no se encontró diferencias estadísticamente significativas. Tampoco se observaron diferencias en el total de los hemisferios (figura 21, anexo 10).

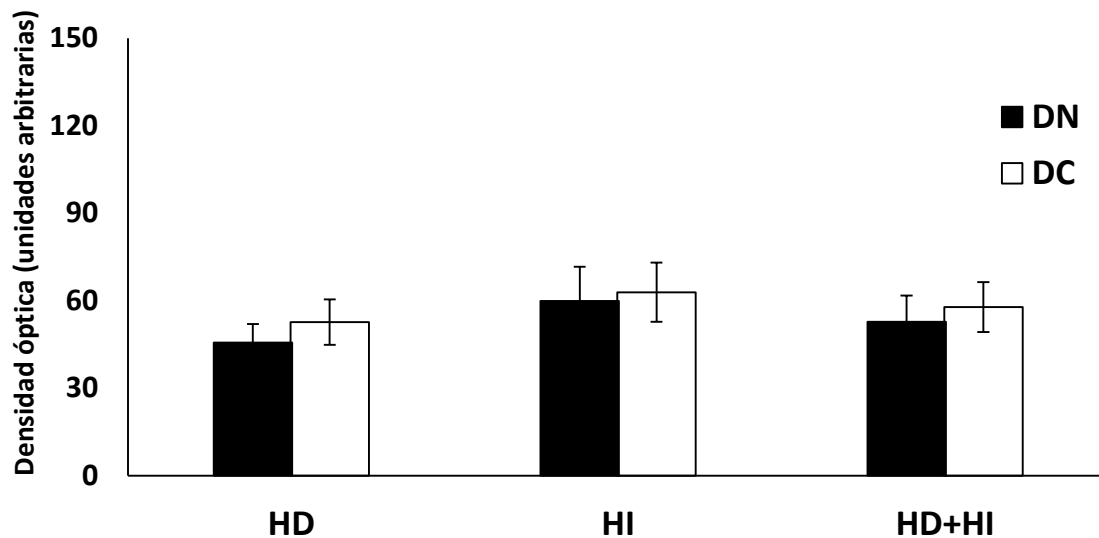


Figura 21: Gráfica de la densidad óptica de la capa granular por hemisferios. Expresión del cotransportador KCC2 por densidad óptica de la capa granular en los hemisferio derecho (HD), izquierdo (HI) y en ambos hemisferios (HD+HI) del grupo de dieta normal (DN) y cetogénica (DC). No existieron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los casos analizados.

8.6.3. Capa hilar

Los valores promedio \pm la desviación estándar en el grupo DN para la densidad óptica de la capa hilar en el hemisferio derecho fue de 60.73 ± 0.80 , para el hemisferio izquierdo de 61.14 ± 6.14 , y en ambos hemisferios es de 60.91 ± 2.97 . Para el grupo DC los valores promedio \pm la desviación estándar en el hemisferio derecho es de 75.14 ± 8.23 , en el hemisferio izquierdo de 86.49 ± 8.93 , y para ambos hemisferios de 80.82 ± 7.41 .

Después de comparar estos valores con la prueba estadística t de Student para muestras independientes se observó que existen diferencias estadísticamente significativas entre el hemisferio derecho del grupo DN respecto del grupo DC, siendo la densidad óptica mayor (23.82%) en el grupo DC. De igual manera la densidad óptica para KCC2 en el hemisferio izquierdo fue significativamente

mayor (41.46%) en el grupo DC en comparación con la del grupo DN. Finalmente cuando se comparó la expresión del cotransportador KCC2 de ambos hemisferios entre el grupo DN y DC, se observó un aumento significativo (32.68%) de este parámetro en grupo DC respecto del grupo DN (figura 22, anexo 11).

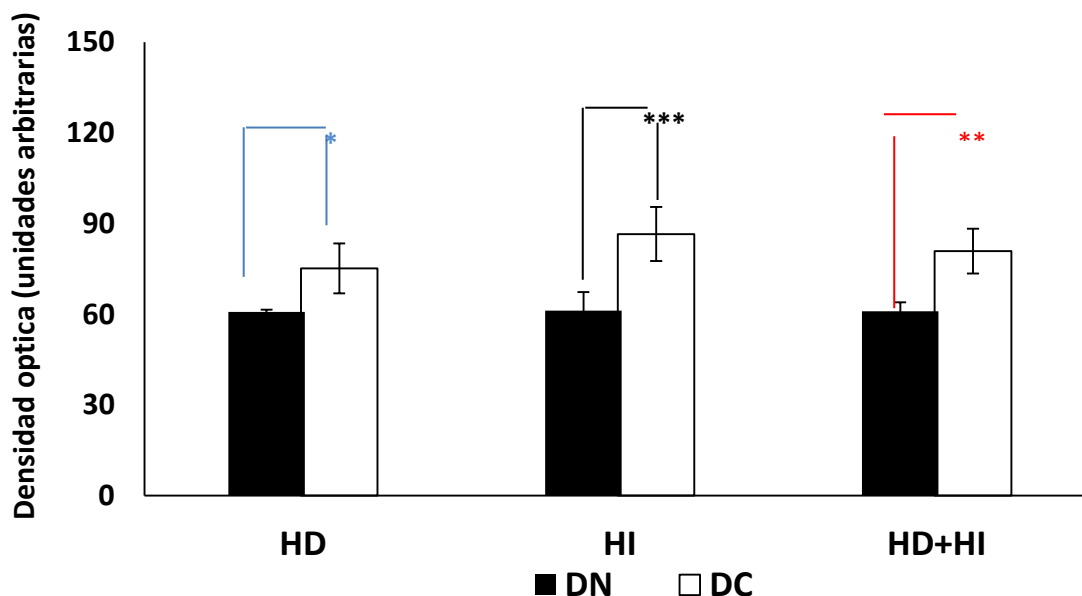


Figura 22: Gráfica de la densidad óptica de la capa hilar por hemisferios. Expresión del cotransportador KCC2 por densidad óptica de la capa hilar en los hemisferios derecho (HD), izquierdo (HI) y en ambos hemisferios (HD + HI) del grupo de dieta normal (DN) y cetogénica (DC). Se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar el hemisferio derecho del grupo DN contra el hemisferio derecho del grupo DC (*), la expresión de KCC2 fue mayor en el grupo DC. En el hemisferio izquierdo se observó una diferencia altamente significativa (***), siendo la expresión de KCC2 mayor en el grupo DC. Por último al comparar la expresión total en ambos hemisferios se observó una expresión significativamente mayor en el grupo alimentado con una dieta cetogénica respecto del grupo alimentado con una dieta normal DN (**).

9. DISCUSIÓN

Con base a los resultados, no se observaron diferencias significativas en el peso corporal al inicio del experimento, lo cual indica que al momento del destete (21 días de edad postnatal) las condiciones basales de ambos grupos eran iguales, condiciones que se pueden observar en otros trabajos como el de Zhao et al., (2017) que inició su experimento con ratas Sprague-Dawley y pesos corporales iguales en el grupo alimentado con una dieta normal y el grupo alimentado con una dieta cetogénica. En otro estudio se utilizaron ratas Wistar con el mismo peso corporal al inicio antes de proveer diferentes dietas (Yi et al., 2017).

Al finalizar el presente estudio, a los 114 días de edad postnatal y 93 días de dieta cetogénica, no se registraron diferencias significativas en el peso corporal entre los animales del grupo control y experimental. Lo cual indica que la ganancia de peso corporal fue la misma en ambos grupos. Este resultado es parecido al reportado en ratas Sprague-Dawley alimentadas con dieta cetogénica en una relación 4:1 que al igual que en nuestro estudio, la DC no tiene efecto en el peso corporal (Zhao et al., 2017). Probablemente el organismo se va adaptando a la dieta cetogénica a lo largo del tiempo. Sin embargo en otro estudio se reportó lo contrario, Calderón et al., 2017, observaron que la ganancia de peso corporal de ratas Wistar fue menor en los animales alimentados con una DC, así después de 15 días el grupo alimentado con una dieta normal aumento 20.8 g, mientras que el grupo alimentado con una dieta cetogénica solo aumentó 1.2 g. Las diferencias entre este último estudio y el presente pueden deberse a que se usaron diferentes cepas y diferentes periodos de administración.

A simple vista, tanto los animales del grupo control como experimental no presentaron diferencias ni en su comportamiento ni en su estado físico, resultados que también se reportaron en otro trabajo donde se usó el mismo tipo de dieta cetogénica (Harlan Teklad 96355) que se usó en el presente trabajo y que se proveyó durante 4 semanas a ratones (Kwon et al., 2008). Resultados semejantes se observaron en ratas de la cepa Sprague-Dawley, alimentadas con dieta cetogénica que contenía 10% de proteína desde el día 22 postnatal que no presentaron signos de desnutrición o de enfermedad (Bough y Eagles, 1999; Ribeiro et al., 2008).

El presente y otros estudios están acordes en el hecho de que diversos tipos de dietas cetogénicas como la clásica del presente trabajo, o de cadena media (Baliatti et al., 2009) no inducen efectos sobre el peso corporal.

Al realizar la comparación intra grupos o por edad se observó que ambas dietas: normal (Harlan 2018S) y cetogénica (Harlan 96355) producen un aumento en el peso corporal de los animales a lo largo del tiempo de la misma forma, Yan et al., (2016) observo en ratas Sprague-Dawley el aumento de peso corporal durante 8 semanas. En otro estudio se utilizaron ratas adultas de la cepa Long-Evans donde el peso corporal fue incrementando a lo largo del tiempo en los dos grupos utilizados, sin embargo en el grupo de dieta cetogénica se observó menor aumento del peso corporal (Kasprowska et al., 2017). En el presente trabajo se administró la dieta cetogénica durante tres meses ya que a futuro se evaluara el efecto de la dieta cetogénica en un modelo animal de epilepsia y este es el tiempo durante el cual se aplicara la dieta cetogénica. Por otro lado la dieta cetogénica por si sola administrada por un mes no produce efecto en los cotransportadores

NKCC1 y KCC2 (Gómez-Lira et al., 2011), además se ha demostrado que la administración de la dieta cetogénica por más de cuatro meses aumenta la mortalidad de los animales (Liskiewicz et al., 2016).

En cuanto a la concentración de glucosa en sangre periférica al inicio del experimento, los resultados mostraron que no existieron diferencias significativas entre los dos grupos (DN vs DC) al momento destete, lo cual indica que se tenían las mismas condiciones basales al inicio. Al igual que en otro trabajo (Hernández et al., 2018).

Al final del experimento las concentraciones de glucosa en sangre periférica tampoco presentaron diferencias significativas entre los dos grupos, indicando que la dieta cetogénica no tiene efecto sobre este parámetro después de tres meses de su consumo. Dustin y Stafstrom, (2016) apoyan esta idea ya que encontraron que la aplicación de la dieta cetogénica durante tres meses no afecta las concentraciones de glucosa en sangre periférica. Sin embargo se ha observado reducción de la concentración de glucosa después del consumo de dieta cetogénica de manera aguda (por cortos periodos de tiempo) de 4 horas a 2 semanas (Brownlow et al., 2017). Probablemente esto sea debido a que el cuerpo se va adaptando a los niveles de glucosa a lo largo del tiempo.

Las comparaciones intra grupo o por edad indicaron que el grupo control redujo significativamente su concentración de glucosa en sangre periférica al final del experimento respecto del inicio. Esto se observa de igual forma en el grupo de dieta cetogénica. Hernández et al., (2018) reporta que la dieta cetogénica afectó significativamente los niveles séricos de glucosa, de manera que disminuyeron con el tiempo. Hasta el momento del destete las ratas estuvieron sometidos a

leche materna, la cual presenta niveles más elevados de hidratos de carbono en comparación a las dietas utilizadas en este experimento, por lo tanto, la reducción de la concentración de glucosa en sangre periférica al final puede ser debido a esto (Balietti et al., 2010; Mosca y Gianni, 2017). Al parecer la disminución de glucosa a lo largo del tiempo es un efecto normal del desarrollo, fenómeno que también se observó en el grupo de dieta cetogénica.

Respecto a la concentración de β -hidroxibutirato al inicio del experimento, no se encontraron diferencias significativas entre el grupo normal y cetogénico, indicando condiciones iguales al inicio del experimento. Al igual que en el trabajo de Kasprowska-Liskiewicz et al., (2017).

Al final del experimento la concentración de β -hidroxibutirato en sangre periférica son significativamente mayores en el grupo de DC al compararlo con el grupo de DN, lo cual indica un aumento en la cetosis tal como se esperaba, este resultado habla del adecuado funcionamiento de la dieta aplicada en este estudio (Harlan TD.96355). Dustin y Stafstrom, (2016) indicaron que al aplicar la dieta cetogénica se incrementa la concentración de β -hidroxibutarato en sangre en comparación con el grupo control, al igual que en este estudio. En ratas Sprague-Dawley después de dos semanas de la administración de la dieta cetogénica (relación 1:4 de carbohidratos con grasas) se observan las concentraciones de β -hidroxibutarato mayores en comparación con el grupo control (Wang et al., 2017), este resultado concuerda con los datos obtenidos en este estudio. Brownlow et al., (2013). Indica que la dieta cetogénica aumento de manera eficiente la concentración de β -hidroxibutarato en la sangre en comparación con la dieta control a las cuatro semanas, además se demostró en este experimento que la

cetosis se mantenía durante la duración del experimento, y la concentración de β -hidroxibutirato en sangre también estaban en niveles más altos en ratones alimentados con DC a las 16 semanas. En nuestro estudio la concentración de β -hidroxibutirato en sangre se mantienen elevados durante las 12 semanas indicando que la dieta cetogénica produce cetosis a corto mediano y largo plazo.

Para la comparación intra grupo o por edad de la concentración de β -hidroxibutirato en sangre periférica se observó una disminución significativa en el grupo de dieta normal al finalizar el experimento. Debido a que las ratas al nacer se alimentan de leche materna y esto concluye hasta el momento del destete, la energía que las crías utilizan proviene en gran medida del alto contenido de grasas que presenta esta leche, lo que indica que al inicio del experimento las ratas están bajo un efecto de cetosis, el cual se vio modificado en el tiempo en el grupo de DN. El grupo DC antes de comenzar la aplicación de la dieta (destete) se encontraba en un estado alto de cetosis por esto no se observan cambios entre el inicio y final del experimento.

Por otro lado el peso del encéfalo no tuvo efecto significativo al comparar el de los dos grupos (DN y DC). Al observar el cerebro de manera macroscópica se nota menor susceptibilidad, sin embargo falta comparar a nivel microscópico.

La inmunoreactividad del cotransportador KCC2 se dio en las tres capas del giro dentado, esto coincide con un trabajo de nuestro equipo de trabajo Gómez-Lira et al., (2011) el cual indica que el patrón de tinción para KCC2 se da en todas las regiones del giro dentado con una tinción fuerte y discreta en dendritas y somas de algunas neuronas. En la capa molecular se encuentran principalmente

dendritas de las células granulares, esto coincide con Stanfield y Cowan, (1988) los cuales indican que las células granulares generalmente carecen de dendritas basales y, por lo tanto, reciben la mayoría de sus entradas en las dendritas ascendentes que se ramifican superficialmente en la capa plexiforme que la recubre, denominada capa molecular.

Para el caso de la capa granular se observó que la tinción se dio alrededor de los somas de las células granulares es decir en la membrana celular, en la capa hilar se tiñen principalmente procesos neuronales. De manera cualitativa a nivel macroscópico no se observaron cambios en cada región del giro dentado. Liu et al., (2015) observo que la expresión de los cotransportadores NKCC1 y KCC2 se da en la membrana celular de las células de la capa granular. Cabe destacar que KCC2 solo se expresa en las neuronas, esto concuerda con el trabajo de Ma et. al., (2014) el cual indica que la inmunodetección para KCC2 solo se visualizan en neuronas y no en otras células.

La densidad óptica del cotransportador KCC2, se analizó por lateralidad, es decir se comparó el hemisferio derecho del grupo de dieta normal vs el hemisferio derecho del grupo de dieta cetogénica. El hemisferio izquierdo del grupo DN vs hemisferio izquierdo del grupo DC. Finalmente la densidad óptica de ambos hemisferios (derecho e izquierdo) del grupo de DN vs DC.

No se observaron diferencias significativas en la capa molecular en ninguna de las comparaciones por lateralidad (hemisferios derecho, izquierdo y total) ni en la capa granular.

La dieta cetogénica administrada durante tres meses no tiene efecto en la inmunoreactividad para KCC2 en la capa molecular, esto concuerda con un

artículo de nuestro equipo de trabajo Gómez-Lira et al., (2011) el cual indica que no se presentan cambios en la inmunoreactividad del cotransportador KCC2 en la capa molecular al administrar la dieta cetogénica durante un mes. El presente trabajo indica que tampoco hay efectos por la dieta a largo plazo (tres meses).

Para el caso de la capa granular no se observan cambios en la expresión del cotransportador KCC2 al aplicar la dieta cetogénica durante tres meses, de igual forma Gómez-Lira et al., (2011) no observan cambios en la expresión de este cotransportador en la capa granular durante un mes de administración de la dieta cetogénica.

Con respecto a la capa hilar se observaron diferencias significativas al hacer la comparación entre el grupo de DN contra DC por lateralidad. En el hemisferio derecho se nota un aumento significativo de la expresión del cotransportador KCC2 en el grupo de dieta cetogénica, esto se presenta con la misma tendencia en el hemisferio izquierdo y al conjuntar ambos hemisferios. Lo que indica que la dieta cetogénica aplicada durante tres meses causa efectos en la capa hilar en cada uno de los hemisferios. Gómez-Lira et al., (2011) no concuerda con nuestros resultados ya que ese trabajo no se observaron diferencias significativas en la capa hilar al comparar DN vs DC, sin embargo la administración de la dieta se dio durante un mes. Los datos anteriores, indican que la dieta cetogénica tiene un efecto diferencial en cada una de las capas del giro dentado. Existen múltiples mecanismos potenciales por los cuales la dieta cetogénica puede alterar la función del sistema nervioso central (SNC) (Clanton et al., 2017; Lima et al., 2014; McNally y Hartman, 2012), además los cuerpos cetónicos producidos por la administración de una dieta cetogénica, también tienen efectos directos sobre las células

neuronales; el β -hidroxibutirato y el acetoacetato disminuyeron el glutamato y los mEPSCs al competir con el cloruro en las neuronas piramidales CA1 (Juge et al., 2010). Bought et al., (2003) reporta alteraciones electrofisiológicas en animales alimentados con una dieta cetogénica restringida en calorías. Wang et al., (2016) observaron que la DC aumentó los niveles de expresión de la proteína KCC2, sin afectar la expresión de NKCC1. Además, la dieta cetogénica evitó la regulación negativa de KCC2 inducida por kindling y la regulación positiva de NKCC1. Este hallazgo sugiere que la dieta cetogénica puede disminuir los niveles de cloro intracelular modulando el equilibrio entre las expresiones de proteínas KCC2 y NKCC1, lo que contribuye a una reducción de la excitabilidad neuronal mediada por GABA. Ben-Ari (2014) demostró que un nivel alto de β -hidroxibutirato es capaz de inducir un cambio en el potencial de membrana de GABA en neuronas inmaduras lo cual podría modificar la actividad del cotransportador KCC2. En un estudio se midió la expresión de los cotransportadores de cloruro NKCC1 y KCC2 que regulan el gradiente electroquímico de cloruro necesario para las inhibiciones de GABA_A, en ratas expuestas a diferentes concentraciones de etanol los resultados mostraron que ambos cotransportadores se expresaron en el cuerpo de las células piramidales del CA1, además, el marcaje con KCC2 fue más fuerte en la membrana celular. Kourdougli et al., (2017) observaron que al realizar una prueba inmunohistoquímica contra KCC2 en secciones de rata tratadas con pilocarpina estas mostraron un patrón de inmunorreactividad citoplasmática preferencial en el día 1 después del estado epiléptico con una tendencia a regresar a las condiciones del grupo control en el día 14 pero con menor intensidad de fluorescencia. Esto contrasta con las condiciones de control, en las

que el KCC2 mostró un patrón perisomático fuerte en el día 5, la tinción de KCC2 fue muy baja y difusa dentro de los cuerpos celulares de las neuronas. Estos hallazgos, muestran un cambio general en la distribución neuronal de KCC2, siendo consistentes dentro de las regiones DG, CA3 y CA1.

Contrario a esto Stafstrom et al., (1999), indicó que la DC no genera cambios en la transmisión sináptica en ratas adultas.

10. CONCLUSIONES

1. La dieta cetogénica no afecta el peso corporal, el peso cerebral y la concentración de glucosa en sangre periférica.
2. La dieta cetogénica aumenta la concentración de β -hidroxibutirato en sangre periférica induciendo un estado de cetosis que se mantiene hasta por tres meses.
3. El tratamiento con una dieta cetogénica por tres meses no modifica la expresión del cotransportador KCC2 en la capa molecular y granular del giro dentado de la rata.
4. El tratamiento por tres meses con una dieta cetogénica aumenta la expresión del cotransportador KCC2 en la capa hilar del giro dentado de la rata.
5. El aumento en la expresión del cotransportador KCC2 podría explicar, al menos en parte, la efectividad de la dieta cetogénica para el control de las crisis epilépticas.
6. Es probable que el mecanismo de acción por el que actúa la dieta cetogénica sea a través del aumento de la expresión del cotransportador KCC2 que introduce cloro a las células, produciendo así un efecto inhibitor del neurotransmisor GABA.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alberti MJ, Agostinho A, Argumedo L, Armeno M, Blanco V, Bouquet C et al. Recomendación para el manejo clínico pediátrico de la dieta cetogénica en el tratamiento de la epilepsia refractaria. Arch Argent Pediatr. 2016;114:56-63.
2. Augustin K, Khabbush A, Williams S, Eaton S, Orford M, Cross HJ et al. Mechanisms of action for the médium-chain triglyceride ketogenic diet in neurological and metabolic disorders. Lancet Neurol. 2018;17:84-93.
3. Arias GF. ¿Cómo llevar a cabo un protocolo? En: Álvarez IM, Arias GF, editores. Introducción a la metodología de la investigación en ciencias de la administración y del comportamiento. 1ª ed. México: Trillas; 2001. p. 9-33.
4. Balietti M, Fattoretti P, Giorgetti B, Casoli T, Di Stefano G, Platano D et al. Effect of two médium chain triglycerides-supplemented diets on synaptic morphology in the cerebellar cortex of late-adult rats. Microsc Res Tech. 2009;72:933-938.
5. Balietti M, Casoli T, Di Stefano G, Giorgetti B, Aicardi G, Fattoretti P. Ketogenic diets: an historical antiepileptic therapy with promising potentialities for the aging brain. Ageing Res Rev. 2010;9:273-279.
6. Ben-Ari Y. The GABA excitatory/inhibitory developmental sequence a personal journey. Neurosci. 2014;279:187-219.
7. Brietzke E, Mansur RB, Subramaniapillai M, Balanzá MV, Vinberg M, Gonzalez PA et al. Ketogenic diet as a metabolic therapy formood disorders: evidence and developments. Neurosci Bio Behav Rev. 2018;94:11-16.

8. Bough KJ, Eagles DA. A ketogenic diet increases the resistance to pentylenetetrazole-induced seizures in the rat. *Epilepsia*. 1999;40:138-143.
9. Bough KJ, Schwartzkroin PA, Rho JM. Calorie restriction and ketogenic diet diminish neuronal excitability in rat dentate gyrus in vivo. *Epilepsia*. 2003;44:752-760.
10. Brady RJ. Neuronas y neurotransmisores. En Brown J, Cruz T, editores. *Sistema nervioso*. 5a ed. México: Limusa; 1991. p. 80-82.
11. Brownlow ML, Benner L, D'Agostino D, Gordon NM, Morgan D. Ketogenic diet improves motor performance but not cognition in two mouse models of alzheimer's pathology. *PLOS*. 2013;8:1-10.
12. Brownlow ML, Jung SH, Moore RJ, Bechmann N, Jankord R. Nutritional ketosis affects metabolism and behavior in Sprague-Dawley rats in both control and chronic stress environments. *Mol Neurosci*. 2017;10:1-17.
13. Calderón N, Betancourt L, Hernández L, Rada P. A ketogenic diet modifies glutamate, gamma-aminobutyric acid and agmatine levels in the hippocampus of rats: a microdialysis study. *Neurosci Letters*. 2017; 642:158-162.
14. Cassel JC, Duconseille E, Jeltsch H, Will B. The fimbria-fornix/cingular bundle pathways: a review of neurochemical and behavioural approaches using lesions and transplantation techniques. *Prog Neurobiol*. 1997;51:663-716.
15. Castaño CJJ, Campos QYA, Duque JCA, Grisales AE, Mera RTM, Rodríguez AGA et al. Caracterización de la población con epilepsia atendida en un hospital infantil en Manizales 2013-2014. *Rev Ces Med*. 2016;30:39-147.

16. Cárdenas-Villalvazo A, López-Espinoza A, Martínez AG, Franco K, Díaz F, Aguilera V et al. Consumo de alimento, crecimiento y ansiedad tras estrés por hacinamiento o aislamiento de ratas. *Rev Mex Anal Conducta*. 2010;36:129-142.
17. Cornejo EV. Dieta cetogénica en pediatría. En: Sanjurjo P, Baldellou A, editores. *Diagnóstico y tratamiento de enfermedades metabólicas hereditarias*. 3a ed. Madrid: Ergón; 2010. p. 265 – 273.
18. Cortes RC, Galindo F, Galicia IS, Flores A. GABA: ¿dualidad funcional? Transición durante el neurodesarrollo. *Rev Neurol*. 2011;52:665-675.
19. Cuauhtémoc SS, Ramírez EJ, Solís OS. El sistema de inhibición GABAérgico implicado en la regulación de la ingesta alimentaria y obesidad. *Rev Mex Neuroci*. 2013;14:262-271.
20. Cheung THC, Cardenal RN. Hippocampal lesions facilitate instrumental learning with delayed reinforcement but induce impulsive choice in rats. *BMC Neuroscience*. 2005;6:1-24.
21. Clanton MR, Wu G, Akabani G, Aramayo R. Control of seizures by ketogenic diet-induced modulation of metabolic pathways. *Amin Acids*. 2017;49:1-20.
22. Dustin SM, Stafstrom CE. Ketogenic diet, but not polyunsaturated fatty acid diet, reduces spontaneous seizures in juvenile rats with kainic acid-induced epilepsy. *Epilepsy Res*. 2016;6:1-7.
23. Fisher RS, Shafer MN, Souza DC. Revised classification of seizures. *International League Against Epilepsy*. 2017;58:1296–1304.

24. Gómez-Lira G, Mendoza-Torreblanca JG, Granados-Rojas L. Ketogenic diet does not change NKCC1 and KCC2 expression in rat hippocampus. *Epilepsy Res.* 2011;96:66-171.
25. Hernández AR, Hernández CM, Campos KT, Truckenbrod LM, Sakarya Y, McQuail JA et al. The antiepileptic ketogenic diet alters hippocampal transporter levels and reduces adiposity in Aged Rats. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2018;73:450-458.
26. Juge N, Gray AJ, Omote H, Miyaji T, Inoue T, Hara C et al. Metabolic control of vesicular glutamate transport and release. *Neuron.* 2010;38:99-112.
27. Kasprowska-Liskiewicz D, Li'skiewicz AD, Nowacka CMM, Nowicka J, Malecki A, Barski J. The ketogenic diet affects the social behavior of young male rats. *Physiol Behav.* 2017;179:168-177.
28. Kossoff EH, Zupec-Kania BA and Rho JM. Ketogenic Diets: An Update for Child Neurologists. *J Child Neurol.* 2009;24:979-988.
29. Kourdougli N, Pellegrino C, Matti RJ, Khirug S, Chazal G, Kaisa KJT et al. Depolarizing GABA contributes to glutamatergic network rewiring in epilepsy. *Neurosci.* 2017;81:1-29.
30. Kverneland M, Molteberg E, Haavardsholm CK, Pedersen S, Ramm PA, Nakken OK. Diattbeh andlingav epilepsi. *Tidsskrift for den norskelegeforening.* 2017;137:55-62.
31. Kwon YS, Jeong SW, Kim DW, Choi ES, Son BK. Effects of the ketogenic diet on neurogenesis after kainic acid-induced seizures in mice. *Epilepsy Res.* 2008;78:186-194.

32. Lambruschini FN. Fisiopatología del efecto antiepiléptico. En Lambruschini FN, editor. Dieta cetogénica, aspectos clínicos, aplicación dietética. Barcelona: Spanish Publishers Associates; 2012. p. 13-22.
33. Lee CA, Buele CS, López IM. Histología del sistema nervioso. En: Lozano K, Maza CJ, Aguilar C, editores. Anatomía y fisiología del sistema nervioso. Ecuador: Universidad Técnica de Machala; 2012. p. 59-75.
34. Lima AP, Pereira BSL, Teixeira DNR. Neurobiochemical mechanisms of a ketogenic diet in refractory epilepsy. Clinics. 2014;69:699-705.
35. Liskiewicz AD, Kasprowska D, Wojakowska A, Polanski K, Lewin-Kowalik J, Kotulska K et al. Long-term high fat ketogenic diet promotes renal tumor growth in a rat model of tuberous sclerosis. Sciens Report. 2016;6:1-13.
36. Liu J, Feng L, Xu-dong T, Jie MA, Meng M, Feng-zhi W et al. Sini powder decoction alleviates mood disorder of insomnia by regulating cation-chloride cotransporters in hippocampus. Chin J Integr Med. 2015;23:1-7.
37. López GFJ, Rodríguez OX, Gil NRA, Carreño MM, Serratos FJ, Villanueva HV et al. Epilepsia resistente a fármacos. Concepto y alternativas terapéuticas. Neurol. 2015;30:439-446.
38. Ma JY, Zhang SP, Guo LB, Li YM, Li Q, Wang SQ et al. KCC2 expression changes in diazepam-treated neonatal rats with hypoxia-ischaemia brain damage. Brain Research. 2014;1563:22-30.
39. McDonald TJW, Mackenzie C, Cervenka MD. Ketogenic diets for adults with highly refractory epilepsy. Epilepsy Current. 2017;17:346-350.
40. McNally AM, Hartman LA. Ketone bodies in epilepsy. J Neurochem. 2012;121:28-35.

41. Mercado A, Melo Z. Aspectos fisiopatológicos de los cotransportadores de K⁺:Cl. *Rev Invest Clin.* 2014;66:173-180.
42. Mellado OYA, Núñez OL. Efecto de la información sobre la enfermedad en la calidad de vida de los pacientes con epilepsia. *An Med.* 2016;61:105-11.
43. Mosca F, Gianni ML. Human milk: composition and health benefits. *La Pediatr Med e Chir.* 2017;39:47-52.
44. Moya VJ. Dieta Cetogénica en Epilepsia. *Rev Chil Epilep.* 2016;1:10-15.
45. Nieuwenhuys R. Anatomía del sistema nervioso. En: Rodríguez, editor. *Sistemas, estructuras y células que componen nuestro sistema nervioso.* 1ª ed. España: Médica Panamericana; 2009. p. 56-81.
46. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. p.1-58. *Diario oficial de la federación.* 31/05/1999. En. www.dof.gob.mx.
47. O'Mara SM, Commins S, Anderson M and Gigg J. The subiculum: a review of form, physiology and function. *Prog Neurobiol.* 2001;64:129-155.
48. Olivares HJD, Juárez AE, García GF. El hipocampo: neurogénesis y aprendizaje. *Rev Med UV.* 2015;1:21-28.
49. Pérez-Guisado J. Los triglicéridos de cadena media, agentes para perder peso, inducir la cetosis y mejorar la salud en general. *Rev Esp Obesid.* 2010;8:124-129.
50. Ribeiro LC, Chittó AL, Müller AP, Rocha JK, Castro DSM, Quincozes-Santos A et al. Ketogenic diet-fed rats have increased fat mass and phosphoenolpyruvate carboxykinase activity. *Mol Nutr Food Res.* 2008;52:1365-1371.

51. Rodríguez Sáez S. Activación de la neurogénesis en el hipocampo de ratón adulto por factores embrionarios. (Tesis de maestría). Valladolid: Biblioteca Universitaria, Universidad de Valladolid; 2015.
52. Shkurovich BP, Collado CMA. Avances en el manejo de la epilepsia. Rev Neurol Neuroci Psi. 2017;45:26-31.
53. Stanfield BB, Cowan WM. An EM autoradiographic study of the hypothalamo-hippocampal projection. Brain Resch. 1984;309:299-307.
54. Stafstrom CE, Wang C, Jensen FE. Electrophysiological observations in hippocampal slices from rats treated with the ketogenic diet. Dev Neurosci. 1999;21:393-399.
55. Thibodeau GA, Patton KT. Sistema nervioso central. En: Patton KT editor. Anatomía y Fisiología. 6ª ed. España: London Et; 2007. p. 483.
56. Tortosa MA, Reiriz PJ. Enfermera virtual. Colegio Oficial de enfermeras. (Internet). Barcelona (citado 10 Dic 2018). Sistema nervioso: Anatomía. Disponible:
https://www.infermeravirtual.com/esp/actividades_de_la_vida_diaria/ficha/funciones_del_sistema/sistema_nervioso#generalidades.
57. Vaccarezza MM, Toma VM, Ramos GJD, Diez CG, Agosta GE. Tratamiento de la epilepsia refractaria con dieta de Atkins modificada. Arch Argent Pediatr. 2014;112:345-357.
58. Valverde AE. Receptores GABA. Hospital Nacional Psiquiátrico de la Universidad de Costa Rica (Internet). 2008 (citado 20 enero 2018); 1:8-16. Disponible en: www.binasss.sa.cr/bibliotecas/bhp/cupula/v24n1-2/art2.pdf.

59. Wang S, Ding Y, Yan DX, Rong LZ, Hong SC, Jin B et al. Effectiveness of ketogenic diet in pentylenetetrazol-induced and kindling rats as well as its potential mechanisms. *Neurosci Lett*. 2016;614:1-6.
60. Wang X, Wu X, Liu Q, Kong G, Zhou J, Jiang J et al. Ketogenic metabolism inhibits histone deacetylase (HDAC) and reduces oxidative stress after spinal cord injury in rats. *Neurosci*. 2017;366:36-43.
61. WIKIMEDIA COMMONS (Internet). América Latina: Wikimedia commons; 2017 (actualizado 23 de enero del 2019; citado 19 Dic 2018). Disponible en: https://commons.wikimedia.org/w/index.php?title=File:Complete_neuron_cell_diagram_es.svg&oldid=270112018.
62. Wu Y, Liu A. Autoimmune factors and epilepsy. *J Cen South Univ*. 2017;42:1452-1457.
63. Yan J, Lu Y, Jia M, Wang X, Zhang Z, Hou Q et al. Ketogenic diet attenuates spatial and item memory impairment in pentylenetetrazol-kindled rats. *Brain Res*. 2016;1646:451-458.
64. Yi W, Xic X, Du M, Bu Y, Wu N, Yang H et al. Green tea polyphenols ameliorate the early renal damage induced by a high-fat diet via ketogenesis/SIRT3 pathway. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:1-14.
65. Youngson NA, Morris MJ, Ballard WO. The mechanisms mediating the antiepileptic effects of the ketogenic diet, and potential opportunities for improvement with metabolism-altering drugs. *Seizure*. 2017;52:15-19.
66. Zhao M, Huang X, Cheng X, Lin X, Zhao T, Wu L et al. Ketogenic diet improves the spatial memory impairment caused by exposure to hypobaric hypoxia through increased acetylation of histones in rats. *PLOS*. 2017;12:1-16.

12. ANEXOS

Anexo 1. Hoja técnica de la dieta normal.

2018S

ENVIGO

Teklad Global 18% Protein Rodent Diet (Sterilizable)

Product Description- 2018S is a fixed formula, autoclavable diet manufactured with high quality ingredients and designed to support gestation, lactation, and growth of rodents. 2018S does not contain alfalfa, thus lowering the occurrence of natural phytoestrogens. Typical Isoflavone concentrations (daidzein + genistein aglycone equivalents) range from 150 to 250 mg/kg. Exclusion of alfalfa reduces chlorophyll, improving optical imaging clarity. Absence of animal protein and fish meal minimizes the presence of nitrosamines. 2018S is supplemented with additional vitamins to ensure nutritional adequacy after autoclaving. Also available certified (20188C), the diet most commonly fed in Envigo Rodent Colonies.

Ingredients (in descending order of inclusion)- Ground wheat, ground corn, wheat middlings, dehulled soybean meal, corn gluten meal, soybean oil, calcium carbonate, dicalcium phosphate, brewers dried yeast, iodized salt, L-lysine, DL-methionine, choline chloride, kaolin, menadione sodium bisulfite complex (source of vitamin K activity), magnesium oxide, vitamin E acetate, calcium pantothenate, thiamin mononitrate, manganous oxide, niacin, ferrous sulfate, zinc oxide, riboflavin, vitamin A acetate, pyridoxine hydrochloride, copper sulfate, vitamin B₁₂ supplement, folic acid, calcium iodate, biotin, vitamin D₃ supplement, cobalt carbonate.

Macronutrients		
Crude Protein	%	18.6
Fat (ether extract) ^a	%	6.2
Carbohydrate (available) ^b	%	44.2
Crude Fiber	%	3.5
Neutral Detergent Fiber ^c	%	14.7
Ash	%	5.3
Energy Density ^d	kcal/g (kJ/g)	3.1 (13.0)
Calories from Protein	%	24
Calories from Fat	%	18
Calories from Carbohydrate	%	58
Minerals		
Calcium	%	1.0
Phosphorus	%	0.7
Non-Phytate Phosphorus	%	0.4
Sodium	%	0.2
Potassium	%	0.6
Chloride	%	0.4
Magnesium	%	0.2
Zinc	mg/kg	70
Manganese	mg/kg	100
Copper	mg/kg	15
Iodine	mg/kg	6
Iron	mg/kg	200
Selenium	mg/kg	0.23
Amino Acids		
Aspartic Acid	%	1.4
Glutamic Acid	%	3.4
Alanine	%	1.1
Glycine	%	0.8
Threonine	%	0.7
Proline	%	1.6
Serine	%	1.1
Leucine	%	1.8
Isoleucine	%	0.8
Valine	%	0.9
Phenylalanine	%	1.0
Tyrosine	%	0.6
Methionine	%	0.6
Cystine	%	0.3
Lysine	%	1.1
Histidine	%	0.4
Arginine	%	1.0
Tryptophan	%	0.2

Standard Product Form: Pellet

Vitamins		
Vitamin A ^{e,f}	IU/g	30.0
Vitamin D ₃ ^{g,h}	IU/g	2.0
Vitamin E	IU/kg	135
Vitamin K ₃ (menadione)	mg/kg	100
Vitamin B ₁ (thiamin)	mg/kg	117
Vitamin B ₂ (riboflavin)	mg/kg	27
Niacin (nicotinic acid)	mg/kg	115
Vitamin B ₆ (pyridoxine)	mg/kg	26
Pantothenic Acid	mg/kg	140
Vitamin B ₁₂ (cyanocobalamin)	mg/kg	0.15
Biotin	mg/kg	0.90
Folate	mg/kg	9
Choline	mg/kg	1200
Fatty Acids		
C16:0 Palmitic	%	0.7
C18:0 Stearic	%	0.2
C18:1ω9 Oleic	%	1.2
C18:2ω6 Linoleic	%	3.1
C18:3ω3 Linolenic	%	0.3
Total Saturated	%	0.9
Total Monounsaturated	%	1.3
Total Polyunsaturated	%	3.4
Other		
Cholesterol	mg/kg	-

^a Ether extract is used to measure fat in pelleted diets, while an acid hydrolysis method is required to recover fat in extruded diets. Compared to ether extract, the fat value for acid hydrolysis will be approximately 1% point higher.

^b Carbohydrate (available) is calculated by subtracting neutral detergent fiber from total carbohydrates.

^c Neutral detergent fiber is an estimate of insoluble fiber, including cellulose, hemicellulose, and lignin. Crude fiber methodology underestimates total fiber.

^d Energy density is a calculated estimate of metabolizable energy based on the Atwater factors assigning 4 kcal/g to protein, 9 kcal/g to fat, and 4 kcal/g to available carbohydrate.

^e Indicates added amount but does not account for contribution from other ingredients.

^f 1 IU vitamin A = 0.3 µg retinol

^g 1 IU vitamin D = 25 ng cholecalciferol

For nutrients not listed, insufficient data is available to quantify.

Nutrient data represent the best information available, calculated from published values and direct analytical testing of raw materials and finished

Anexo 2. Hoja técnica de la dieta cetogénica.

Teklad Custom Diet

TD.96355

Ketogenic Diet



Formula	g/Kg
Casein	173.3
DL-Methionine	2.8
Vegetable Shortening, hydrogenated (Crisco)	688.4
Corn Oil	88.2
Cellulose	87.87
Vitamin Mix, Teklad (40060)	13.0
Choline Bitartrate	2.6
TBHQ, antioxidant	0.13
Mineral Mix, Ca-P Deficient (79055)	20.0
Calcium Phosphate, dibasic	19.3
Calcium Carbonate	8.2
Magnesium Oxide	0.4

Footnote
A very high fat diet with almost no carbohydrate. The ratio of fat to protein + carbohydrate in this ketogenic diet is approximately 4.25.

Selected Nutrient Information ¹		
	% by weight	% kcal from
Protein	15.3	9.2
Carbohydrate	0.5	0.3
Fat	67.4	90.5
Kcal/g	6.7	

¹ Values are calculated from ingredient analysis or manufacturer data

Speak With A Nutritionist
 + (800) 483-5523
 + askanutritionist@envigo.com

Teklad diets are designed & manufactured for research purposes only.

Key Features

- + Purified Diet
- + Ketogenic
- + Crisco
- + Rodent

Key Planning Information

- + Products are made fresh to order
- + Store product at 4°C or lower
- + Use within 6 months (applicable to most diets)
- + Box labeled with product name, manufacturing date, and lot number
- + Replace diet at minimum once per week
More frequent replacement may be advised
- + Lead time:
 - 2 weeks non-irradiated
 - 4 weeks irradiated

Product Specific Information

- + Powder (paste)
- + Minimum order 3 Kg
- + Irradiation available upon request

Options (fees will apply)

- + Rush order (pending availability)
- + Irradiation (see Product Specific Information)

Contact Us
 Obtain pricing - Check order status
 + tekklad@envigo.com
 + (800) 483-5523



International Inquiry (outside USA or Canada)
 + askanutritionist@envigo.com

Place Your Order (USA & Canada)
 Please Choose One
 + envigo.com/tekklad-orders
 + tekkladorders@envigo.com
 + (800) 483-5523
 + (608) 277-2066 *fax/order*

© 2015 Envigo

162214


Anexo 3. Hoja técnica de vitaminas de la dieta cetogénica.

Teklad Custom Diet

CA.40060

Vitamin Mix, Teklad



Formula	g/Kg	Key Features
p-Aminobenzoic Acid	11.0132	+ Vitamin Mix
Vitamin C, ascorbic acid, coated (97.5%)	101.8804	+ General Purpose
Biotin	0.0441	+ Commonly Used
Vitamin B ₁₂ (0.1% in mannitol)	2.9738	
Calcium Pantothenate	6.8079	
Choline Dihydrogen Citrate	349.8818	
Folic Acid	0.1882	
Inositol	11.0132	
Vitamin K ₃ , menadione	4.9669	
Niacin	9.9119	
Pyridoxine HCl	2.2028	
Riboflavin	2.2028	
Thiamin (B1%)	2.2028	
Vitamin A Palmitate (500,000 IU/g)	3.9848	
Vitamin D ₃ , cholecalciferol (500,000 IU/g)	0.4406	
Vitamin E, DL-alpha tocopheryl acetate (500 IU/g)	24.2281	
Corn Starch	488.8878	
		Key Planning Information
		+ Products are made fresh to order
		+ Lead time 2 weeks
		+ Store product at 4°C or lower
		+ Use within 6 months (applicable to most mixes)
		+ Box labeled with product name, manufacturing date, and lot number
		Product Specific Information
		+ Powder
		+ Minimum order 500 grams
		Options (fees will apply)
		+ Rush order (pending availability)
		+ Vacuum packaging (1 and 2 Kg)
		Contact Us
		Obtain pricing - Check order status
		+ tekklad@envigo.com
		+ (800) 483-5523
		
		International Inquiry (outside USA or Canada)
		+ askanutritionist@envigo.com
		Place Your Order (USA & Canada)
		Please Choose One
		+ envigo.com/tekklad-orders
		+ tekkladorders@envigo.com
		+ (800) 483-5523
		+ (608) 277-2066 <small>fax/invoice</small>
Footnote		
Designed as a general purpose, well-fortified vitamin mix. The recommended use level is 1% in rodent diets, but may be used in diets for other species as well. This mix includes a source of choline and vitamin C.		
Speak With A Nutritionist		
+ (800) 483-5523		
+ askanutritionist@envigo.com		
Teklad mixes are designed & manufactured for research purposes only.		

© 2015 Envigo

10/2015


Anexo 4. Hoja técnica de minerales de la dieta cetogénica.

Teklad Custom Diet

TD.79055

Mineral Mix, Ca-P Deficient



Formula	g/Kg	Key Features
Sodium Chloride	183.7326	<ul style="list-style-type: none"> + Mineral Mix + Calcium & Phosphorus + Modification of AIN-76 Mineral Mix
Potassium Citrate, monohydrate	676.9816	
Potassium Sulfate	138.1383	Key Planning Information <ul style="list-style-type: none"> + Products are made fresh to order + Lead time 2 weeks + Store in cool, dry conditions + Use within 12 months (applicable to most mixes) + Box labeled with product name, manufacturing date, and lot number
Magnesium Oxide	82.8322	
Manganous Carbonate	8.183	
Ferric Citrate	16.708	
Zinc Carbonate	4.1888	
Cupric Carbonate	0.7864	
Potassium Iodate	0.0282	
Sodium Selenite, pentahydrate	0.0282	
Chromium Potassium Sulfate, dodecahydrate	1.4388	
Footnote		Product Specific Information <ul style="list-style-type: none"> + Powder + Minimum order 500 grams
<p>This is a modification of mineral mix AIN-76 (170915). When used at the rate of 13.369 g/Kg of diet, mineral elements other than Ca and P will be supplied to the diet at rates similar to those provided by 35.0 g/Kg of 170915.</p>		
Speak With A Nutritionist		Options (fees will apply) <ul style="list-style-type: none"> + Rush order (pending availability) + Vacuum packaging (1 and 2 Kg)
<ul style="list-style-type: none"> + (800) 483-5523 + askanutritionist@envigo.com 		Contact Us Obtain pricing - Check order status <ul style="list-style-type: none"> + tekklad@envigo.com + (800) 483-5523 
<p>Teklad mixes are designed & manufactured for research purposes only.</p>		International Inquiry (outside USA or Canada) <ul style="list-style-type: none"> + askanutritionist@envigo.com
		Place Your Order (USA & Canada) Please Choose One <ul style="list-style-type: none"> + www.envigo.com/tekklad-orders + tekkladorders@envigo.com + (800) 483-5523 + (608) 277-2066 <small>fax/order</small>

© 2015 Envigo

Anexo 5. Análisis estadístico del peso corporal.

Comparación entre grupos (grupo DN vs grupo DC)

Parámetro	F de Levene	Significancia de Levene	t de Student para muestras independientes	Significancia estadística	Valor de p
Peso corporal inicial	3.634	0.83	- 0.801	0.440	NS
Peso corporal final	0.270	0.614	0.293	0.775	NS

NS = No significativo

Comparación intra grupos (valor inicial vs valor final)

Parámetro	F de Levene	Significancia de Levene	t de Student muestras relacionadas	Wilcoxon	Significancia estadística	Valor de p
Peso corporal DN	0.478	0.338	- 16.457	No aplica	0.000	***
Peso corporal DC	0.865	0.012	No aplica	- 2.366	0.018	*

DN = Grupo dieta normal, DC = Grupo dieta cetogénica, * ≤ 0.05 , *** ≤ 0.001

Anexo 6. Análisis estadístico de la concentración de glucosa en sangre periférica.

Comparación entre grupos (grupo DN vs grupo DC)

Parámetro	F de Levene	Significancia de Levene	t de Student para muestras independientes	Significancia estadística	Valor de p
Glucosa inicial	0.675	0.429	- 0.673	0.515	NS
Glucosa final	0.404	0.538	0.407	0.692	NS

NS = No significativo

Comparación intra grupos (valor inicial vs valor final)

Parámetro	F de Levene	Significancia de Levene	t de Student muestras relacionadas	Significancia estadística	Valor de p
Glucosa DN	- 0.367	0.474	6.120	0.002	**
Glucosa DC	0.063	0.892	6.885	0.000	***

DN = Grupo dieta normal, DC = Grupo dieta cetogénica, ** < 0.01, *** < 0.001

Anexo 7. Análisis estadístico de la concentración de β -hidroxibutirato en sangre periférica.

Comparación entre grupos (grupo DN vs grupo DC)

Parámetro	F de Levene	Significancia de Levene	t de Student muestras independientes	Significancia estadística	Valor de U de Mann-Whitney	Significancia estadística	Valor de p
β -hidroxibutirato inicial	0.116	0.739	- 0.037	0.742	No aplica	No aplica	NS
β -hidroxibutirato final	5.445	0.040	No aplica	No Aplica	0.000	0.002	**

NS = No significativo, ** < 0.01

Comparación intra grupos (valor inicial vs valor final)

Parámetro	F de Levene	Significancia de Levene	t de Student muestras relacionadas	Wilcoxon	Significancia estadística	Valor de p
β -hidroxibutirato DN	- 0.849	0.033	No aplica	- 2.201	0.028	*
β -hidroxibutirato DC	- 0.495	0.259	- 0.769	No aplica	0.471	NS

DN = Grupo dieta normal, DC = Grupo dieta cetogénica, NS = No significativo, * < 0.05

Anexo 8. Análisis estadístico del peso cerebral.

Comparación entre grupos (grupo DN vs grupo DC)

Parámetro	F de Levene	Significancia de Levene	t de Student muestras independientes	Significancia estadística	Valor de p
Peso cerebral al sacrificio	0.493	0.497	-1.103	0.294	NS

NS = No significativo

Anexo 9. Análisis estadístico de la densidad óptica del cotransportador KCC2 en la capa molecular.

Comparación entre grupos (grupo DN vs grupo DC)

Parámetro	F de Levene	Significancia de Levene	t de Student muestras independientes	Significancia estadística	Valor de p
Capa molecular hemisferio derecho	0.242	0.633	-2.110	0.61	NS
Capa molecular hemisferio izquierdo	3.958	0.075	-1.115	0.291	NS
Capa molecular sumatoria	1.028	0.335	-1.568	0.148	NS

NS = No significativo

Anexo 10. Análisis estadístico de la densidad óptica del cotransportador KCC2 en la capa granular.

Comparación entre grupos (grupo DN vs grupo DC)

Parámetro	F de Levene	Significancia de Levene	t de Student muestras independientes	Significancia estadística	Valor de p
Capa granular hemisferio derecho	0.365	0.559	- 1.651	0.130	NS
Capa granular hemisferio izquierdo	0.87	0.774	- 0.480	0.641	NS
Capa granular sumatoria	0.006	0.940	- 0.984	0.348	NS

NS = No significativo

Anexo 11. Análisis estadístico de la densidad óptica del cotransportador KCC2 en la capa hilar.

Comparación entre grupos (grupo DN vs grupo DC)

Parámetro	F de Levene	Significancia de Levene	t de Student muestras independientes	Significancia estadística	Valor de p
Capa Hilar hemisferio derecho	0.087	0.775	- 2.987	0.015	*
Capa Hilar hemisferio izquierdo	0.675	0.433	- 5.355	0.000	***
Capa Hilar sumatoria	0.737	0.413	- 5.039	0.001	**

* < 0.05, ** < 0.01, *** < 0.001.