



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCiência ANIMAL

Daniella Tavares Pessoa

**Efeito da suplementação lipídica dietética na atividade elétrica cerebral de ratos
normais e submetidos ao *status epilepticus***

**Recife
2016**



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIA ANIMAL

Daniella Tavares Pessoa

Efeito da suplementação lipídica dietética na atividade elétrica cerebral de ratos normais e submetidos ao *status epilepticus*

Tese apresentada ao Programa de Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito para obtenção do grau de Doutor em Biociência Animal.

Orientador: Dr. Romildo de Albuquerque Nogueira

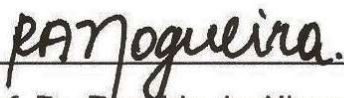
**Recife
2016**

Daniella Tavares Pessoa

Efeito da suplementação lipídica dietética na atividade elétrica cerebral de ratos normais e submetidos ao *status epilepticus*

Tese defendida e aprovada em 26 de fevereiro de 2016.

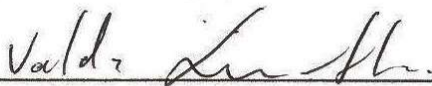
Banca examinadora:



Prof. Dr. Romildo de Albuquerque Nogueira

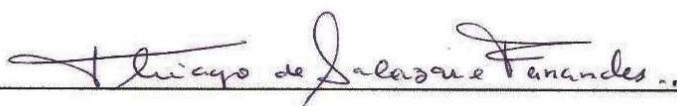
Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal – UFRPE

Presidente



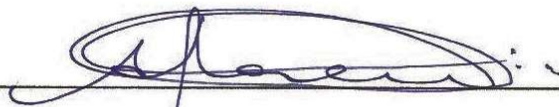
Prof. Dr. Valdir Luna da Silva

Departamento de Fisiologia e Farmacologia – UFPE



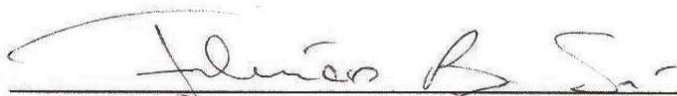
Prof. Dr. Thiago de Salazar e Fernandes

Departamento de Biofísica e Radiobiologia – UFPE



Prof. Dr. Anísio Francisco Soares

Programa de Pós-Graduação em Ciência Tropical – UFRPE



Prof. Dr. Fabrício Bezerra de Sá

Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal – UFRPE

AGRADECIMENTOS

A meus pais, Nazaré Rocha e Alberto Tavares, pelo companheirismo, momentos de descontração e por todo amor, que me trouxe conforto e segurança para que pudesse ultrapassar cada nova etapa. Amo vocês.

Ao meu orientador, Prof. Romildo Nogueira, que merece toda minha gratidão e admiração. Pois apesar de sua larga sabedoria, sempre dispensa atenção e disponibilidade a seus alunos, mesmo para tratar dos assuntos mais simples. Sempre o terei como exemplo em minha vida profissional.

Ao meu noivo, Antônio Lucas das Mercês Filho, pelo incentivo, amizade e compreensão, mesmo quando longe.

A minha amiga Eva Luana, que participou com entusiasmo de cada etapa deste trabalho.

A Aline, Cíntia, Carol, Welma, Vanessa Noiadia, Fabiana Félix e em especial a Ismaela Melo, pela amizade e ajuda em etapas cruciais na realização desse trabalho, tais etapas não seriam possíveis sem vocês.

Ao Prof. Dr. Valdemiro Júnior, pelo auxílio imprescindível nas análises histológicas.

A Leandro Aguiar e a José Radamés pelo auxílio nas análises computacionais dos dados.

À Profa. Marliete Soares, Prof. Emmanuel Pontual, Leandro Aguiar, Gesilda Florenço, Thais Almeida, José Radamés, Cláudio D'Castro, Rubens Felipe, Renata, Victor Felipe..., em especial a Profa. Jeine Emanuele, Eva Luana, Hanna Gracie e Ardilles Juan que participaram de cada etapa desse trabalho e juntos dividimos alguns momentos difíceis e muitos de felicidade. Meu muito obrigada, a todos que compõe o LABTEC, porque juntos construímos um ambiente de trabalho agradável e acolhedor.

Aos professores e funcionários da Pós-Graduação em Biociência animal, em especial a Edna Cherias, pela atenção e ajuda. Aos técnicos do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Márcia, Benício, Admilson, Romildo e Vicente. A Rejane e Mariza, pela disposição em ajudar sempre... A André e a Renata, do Biotério do DMFA, pela sempre disposição em ajudar no manejo dos animais utilizados neste trabalho.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) e a Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de nível superior (CAPES) pelo apoio financeiro, essencial para realização desse trabalho.

*"Se o cérebro humano fosse tão simples que pudéssemos entendê-lo,
seríamos tão simples que não o entenderíamos."
-Lyall Watson*

RESUMO

O cérebro é um órgão constituído de cerca de 60% de lipídios. Entre esses lipídios os mais importantes são os fosfolipídios, os quais podem apresentar em sua cauda hidrofóbica, ácidos graxos saturados e insaturados, e o colesterol. Alterações nas proporções desses lipídios podem alterar as propriedades físico-químicas das membranas das células do sistema nervoso. Desta forma, é razoável inferir que alterações no fornecimento dietético de lipídios possam alterar o funcionamento do cérebro, e essas alterações muitas vezes acarretam variações na atividade elétrica cerebral. Esse trabalho avaliou alterações elétricas e histológicas decorrente da suplementação com ácidos graxos insaturados (ômega-3) e de uma dieta hipercolesterolêmica (DHC), em animais normais e submetidos ao *status epilepticus*. A atividade elétrica dos animais foi registrada através do eletrocorticograma (ECoG), no qual foi realizado o espectro de potência e calculada a potência média para os ritmos cerebrais mais importantes, delta (0,5 - 4Hz), teta (4 - 8 Hz), alfa (8 - 14Hz) e beta (12 - 30Hz). A análise eletrofisiológica mostrou que a suplementação lipídica, tanto proveniente do ômega-3, quanto da DHC, causou uma aceleração da atividade elétrica cerebral basal. Durante o *status epilepticus* os animais suplementados com a DHC, apresentaram maior excitabilidade que o grupo controle e o suplementado com ômega-3, indicando um *status epilepticus* com maior severidade para o grupo alimentado com a DHC. A análise histológica mostrou que o *status epilepticus* causou lesão nas áreas CA1, CA2, CA3 e giro denteado do hipocampo, apresentando morte neuronal severa com vacuolização intensa e desestruturação das camadas celulares. Porém essas lesões foram muito mais tênues nos animais suplementados com ômega-3, revelando um efeito protetor do ômega-3 nas células nervosas durante o *status epilepticus*.

Palavras-chave: Omega-3, colesterol, atividade elétrica cerebral, epilepsia

ABSTRACT

The brain is an organ composed of about 60% of lipids. Among these the most important lipids are the phospholipids, which may present in its hydrophobic tail, saturated and unsaturated fatty acids and cholesterol. Changes in the proportions of these lipids may alter the physicochemical properties of the membranes of the cells of the nervous system. Thus, it is reasonable to infer that changes in the dietary lipid supply may alter brain function; these changes often entail changes in brain electrical activity. This study evaluated electrical and histological changes of the nervous system resulting from supplementation with unsaturated fatty acids (omega-3) and a hypercholesterolemic diet (HCD), in animals normal and submitted to *status epilepticus*. The electrical activity of the animals was registered by ECoG, in which was performed the power spectrum and calculated the average power for the most important brain rhythms, delta (0.5 - 4 Hz), theta (4 - 8 Hz), Alpha (8 - 14 Hz) and beta (12 - 30Hz). Electrophysiological analysis showed that lipid supplementation, both from omega-3 as HCD, caused an acceleration of brain electrical activity. During the *status epilepticus* the animals supplemented with HCD showed a excitability greater than the control group and that animals supplemented with omega-3, indicating a *status epilepticus* with greater severity for the group fed the HCD. Histological analysis showed that the status epilepticus caused injury in the areas CA1, CA2, CA3 and the dentate gyrus of the hippocampus, all of them showing severe neuronal death with intense vacuolization and disintegration of the cell layers. However, these lesions were not easily identified in animals supplemented with omega-3, revealing a protective effect of omega-3 in nerve cells during *status epilepticus*.

Palavras-chave: Omega-3, cholesterol, brain electrical activity, epilepsy.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1 Lipídios do sistema nervoso central	12
2.2 Importância da inclusão dos ômega-3 na dieta para a função cerebral	15
2.3 Importância do colesterol na função cerebral	18
2.4 Dietas hiperlipídicas	20
2.5 Atividade elétrica cerebral	22
2.6 Eletroencefalograma (EEG) e eletrocorticograma (ECoG)	23
2.7 Diferentes ondas cerebrais	24
2.8 A epilepsia	25
2.9 Epilepsia do lobo temporal	28
2.10 Modelo experimental da pilocarpina	28
2.11 Ictogênese: o início das manifestações epileptiformes	29
2.12 Dietas terapêuticas rica em lipídios	30
3. OBJETIVOS	32
3.1 Objetivo geral	32
3.2 Objetivos específicos	32
	33
4 . MATERIAIS E MÉTODOS	
4.1 Desenho experimental	33
4.1.1 Histologia	34
4.1.2 Eletrofisiologia.....	34
4.2 Suplementação com EPA e DHA.....	35

4.3 Dieta hipercolesterolêmica	35
4.4 Provas laboratoriais	36
4.5 Procedimentos para análise histológica	36
4.6 Procedimentos para o registro da atividade elétrica cerebral	37
<i>4.6.1 Procedimento cirúrgico para implante de eletrodo</i>	<i>37</i>
<i>4.6.2 Registro da atividade elétrica cerebral</i>	<i>38</i>
4.7 Análise dos registros de ECoG	39
4.8 Teoria	39
<i>4.8.1 Transformada de Fourier e espectro de potência</i>	<i>39</i>
4.9 Análise estatística	42
 CAPÍTULO I	
Efeito da suplementação com ômega-3 na atividade elétrica cerebral basal e durante o <i>status epilepticus</i> em ratos	51
 CAPÍTULO II	
Efeito da dieta hipercolesterolêmica na atividade elétrica cerebral basal e durante o <i>status epilepticus</i> em ratos	73
 5. CONCLUSÃO DA TESE	95

1. INTRODUÇÃO

Depois do adiposo, o tecido cerebral é o que possui maior concentração de lipídios, com conteúdo lipídico correspondendo a cerca de 60% de seu peso seco (FALINSKA et al., 2012). Essa proporção lipídica elevada indica a importância dos lipídios para estrutura e função desse órgão. A membrana plasmática é uma bicamada lipídica na qual se encontram inseridas proteínas, tais como os canais iônicos nos neurônios e outras células. Estudos indicam que alterações lipídicas podem interferir no funcionamento dessas proteínas (CHATTOPADHYAY e PAILA, 2007). Desta forma, ao alterar o conteúdo lipídico, tanto em qualidade como em quantidade, podem-se provocar alterações no funcionamento dos canais iônicos e consequentemente na excitabilidade cerebral.

Além disso, os lipídios são altamente concentrados na bainha de mielina, a qual atua como isolante elétrico nos axônios dos neurônios, ajudando na propagação do potencial de ação. A manutenção de seu conteúdo lipídico é importante para que o potencial de ação seja propagado em velocidade adequada. Os principais lipídios encontrados no sistema nervoso são colesterol e fosfolipídios (LENT, 2004).

Estudos indicam que o colesterol é fundamental no desenvolvimento e manutenção da plasticidade neuronal (MAUCH, 2001; GORITZ, 2002), no transporte de vesículas sinápticas (KLOPFENSTEIN et al., 2002), na liberação de neurotransmissores (MAUCH, 2001) e na ausência de suprimento de colesterol as transmissões sinápticas são inviabilizadas (BARRES e SMITH, 2001). Além disso, algumas doenças neurológicas estão sendo associadas a alterações no metabolismo do colesterol, como a doença de Alzheimer e a doença de Niemann–Pick do tipo C (SEVIN, et al., 2007; PANCHAL et al., 2010; DI PAOLO e KIM, 2011).

O fosfolipídio é uma molécula formada de modo geral, por um esqueleto de glicerol no qual se une uma cabeça polar e a cadeias de ácidos graxos. Alguns desses ácidos graxos são da família ômega-3 (NELSON e COX, 2004).

A presença de ômega-3 na membrana celular aumenta sua fluidez, sendo importante para a manutenção das propriedades físico-químicas da membrana, além de apresentar importante efeito anti-inflamatório no sistema nervoso. Estudos indicam que níveis reduzidos de ômega-3 no cérebro são acompanhados por *déficit* de aprendizagem e alterações de humor relacionadas às deficiências nos processos de neurotransmissão (HARBEBY et al., 2012; FONTANI et al. 2005). Apesar de sua grande importância, o ômega-3 não pode ser produzido pelo organismo, diferente de outros ácidos graxos da membrana, sendo necessária sua obtenção através da dieta (BELLISSIMO, et al., 2001; GOPEZ, et al., 2005; NAFFAH-MAZZACORATTI, et al., 1995).

Lipídios podem ser adquiridos tanto pela produção própria do organismo como consumidos através da dieta (NELSON e COX, 2004). Desta forma, o conteúdo lipídico dietético pode interferir no sistema nervoso central, seja pelo excesso ou escassez de algum tipo de lipídio, como na dieta ocidental que apresenta altos níveis de colesterol e gordura saturada e é pobre em gorduras insaturadas como o ômega-3 (HEATHER e RICHARD, 2013).

Variações do conteúdo lipídico no sistema nervoso podem interferir em seu funcionamento em vários níveis, o que pode culminar em alterações na atividade elétrica cerebral basal. Essas alterações podem ter uma resposta ainda maior em pacientes com epilepsia. Esses pacientes naturalmente são mais sensíveis a tais alterações, uma vez que seu limiar de excitabilidade se mantém mais baixo, o que provoca a hiperexcitação neuronal característica da epilepsia (CUKIERT, 2006). Diante do exposto, esse trabalho avaliou as alterações na atividade elétrica cerebral basal e durante o *status epilepticus*, provocadas por uma dieta hipercolesterolêmica (DHC) e pela suplementação com ômega-3 em ratos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Lipídios do sistema nervoso central

A membrana plasmática das células tem constituição lipoproteica, estruturada com proteínas ligadas por interações hidrofóbicas a uma bicamada lipídica fluida. Os principais lipídios encontrados na membrana plasmática são fosfolipídios e colesterol. A proporção de lipídios em relação à de proteínas na membrana plasmática varia de uma célula para outra de acordo com a função por ela exercida. A membrana plasmática que forma a bainha de mielina nos neurônios, por exemplo, é composta por 70% de lipídios e 30% de proteínas, enquanto que nos eritrócitos a proporção é de 50% de lipídios para 50% de proteínas. A importância de uma maior quantidade de lipídio na bainha de mielina se dá pela sua função como isolante elétrico, o que aumenta a velocidade de propagação dos impulsos elétricos nos axônios (MURADORI e DEFFUNEII, 2007; FALINSKA et al., 2012).

A bainha de mielina é uma especialização da membrana plasmática de células gliais que envolvem o axônio dos neurônios em camadas concêntricas, aumentando consideravelmente a porção lipídica no sistema nervoso central. Depois do tecido adiposo, o cérebro apresenta o mais elevado teor lipídico, aproximadamente 60% do peso seco (FALINSKA et al., 2012). Além disso, o cérebro é o órgão com maior concentração em colesterol, sendo sua maior parcela (70 - 80%) encontrada na bainha de mielina, onde desempenha papel crítico de isolamento elétrico junto aos fosfolipídios (FALINSKA et al., 2012; CARLSON et al., 2013; HIRRLINGER e NAVE, 2014).

Os fosfolipídios são os principais componentes lipídicos da membrana plasmática. Estes são moléculas anfipáticas, que de modo geral, são formadas por um esqueleto de glicerol no qual se une uma cabeça polar por meio de uma ligação fosfodiéster e cadeias de ácidos graxos através de ligação éster ou amida. Desta forma, a combinação da cabeça polar de um fosfolipídio com ácidos graxos pode originar uma grande diversidade molecular a depender do ácido graxo com a qual se combina. De modo geral, cada fosfolipídio apresenta

duas cadeias de ácidos graxos, uma saturada e uma insaturada (Figura 1) (NELSON e COX, 2004).

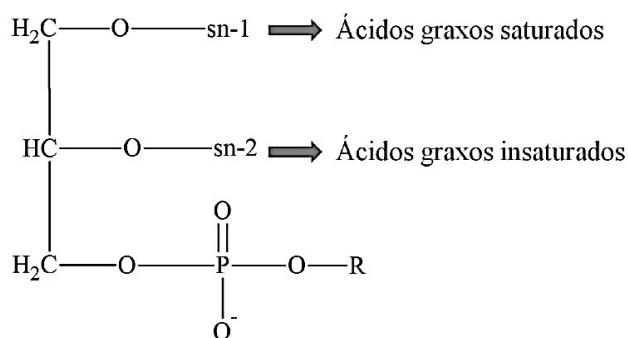


Figura 1. Estrutura básica de um fosfolipídio, sn-1 e sn-2 indicam locais de inserção dos ácidos graxos. Fonte: file:///C:/Users/DESKTOP/Downloads/TeseCorrigidaPriscilaBentoDerogis

O tipo de ácido graxo ligado aos fosfolipídios da membrana plasmática interfere em suas propriedades físico-químicas. Acima da temperatura de transição, na qual a membrana está em seu estado fluido, os ácidos graxos saturados favorecem as interações hidrofóbicas dos fosfolipídios. Por outro lado, os ácidos graxos insaturados, por apresentarem dobras nos locais onde se encontram as ligações duplas, tornam mais difíceis as interações hidrofóbicas nessas regiões. Por conseguinte, quanto maior for a proporção de ácidos graxos saturados menor a fluidez da membrana e quanto maior for a proporção de ácidos graxos insaturados maior será essa fluidez (NELSON e COX, 2004; BRENNAN e CARLSON, 2014). O aumento na fluidez facilita o transporte transmembrana, o que pode favorecer o desencadeamento de potenciais de ação e consequentemente aumento na excitabilidade cerebral (Figura 2) (HORROCKS e FAROOQUI, 2004; FERNSTROM, 1999).

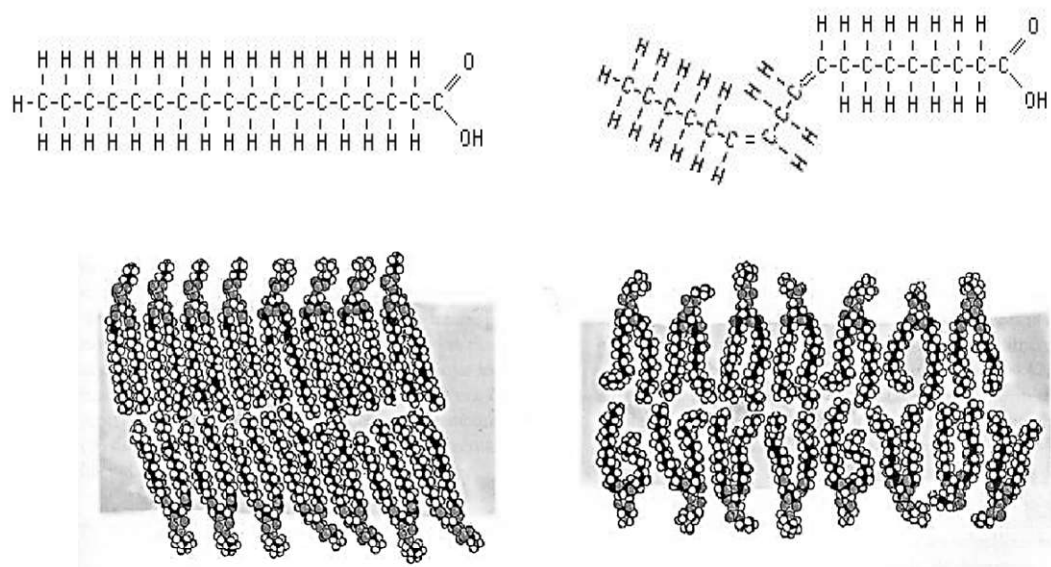


Figura 2. Representação de fosfolipídios com cadeias de ácidos graxos saturadas e insaturadas, respectivamente.

O colesterol, por sua vez, apresenta núcleo com estrutura plana e rígida que interage hidrofobicamente com as cadeias de ácidos graxos dos fosfolipídios, o que, acima da temperatura de transição, diminui a fluidez no centro da membrana plasmática (HORROCKS; FAROOQUI, 2004). Desta forma, a disponibilidade excessiva de colesterol, ao diminuir a fluidez da membrana, pode interferir negativamente no transporte transmembrana e diminuir a excitabilidade neuronal (PESSOA, et al., 2015).

A manutenção das proporções adequadas entre ácidos graxos saturados, insaturados e colesterol é importante para a obtenção da fluidez ótima nas membranas das células do sistema nervoso, em especial os neurônios, para o funcionamento adequado no que tange processos de geração, condução e transmissão de impulsos nervosos. Os níveis de lipídios do sistema nervoso são mantidos pela síntese orgânica e pela dieta. Desta forma, a oferta dietética pode influenciar marcadamente na composição lipídica neural.

2.2 Importância da inclusão dos ômega-3 na dieta para a função cerebral

Diferentes ácidos graxos insaturados e poli-insaturados podem ser formados no fígado e no tecido adiposo através de enzimas de alongamento e dessaturação, utilizando glicose e aminoácidos como substrato. O alongamento se dá pela inserção de átomos de carbono tornando a cadeia longa e a dessaturação se dá pela inserção de duplas ligações, aumentando a insaturação do ácido graxo. Por outro lado, os animais não possuem as enzimas delta-12 e delta-15 dessaturase, responsáveis pela inserção de duplas ligação nos carbonos que antecedem o carbono 9 a partir do grupo metil, sendo, desta forma, incapazes de produzir ácidos graxos das famílias ômega-3 e ômega-6 a partir de um ácido graxo produzido no organismo (NELSON e COX, 2004).

Os ômega-3 constituem uma família de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) de cadeia longa que apresentam a primeira ligação dupla no terceiro carbono a partir do grupo metil, enquanto os ômega-6 apresentam a primeira ligação dupla no carbono 6. O ômega-3 e ômega-6 mais consumidos na dieta são os ácidos alfa-linolênico e linoleico respectivamente. Esses são considerados ácidos graxos essenciais, pois sua obtenção se dá exclusivamente pela dieta. Uma vez adquiridos na dieta, esses ácidos graxos essenciais podem originar uma série de outros ômega-3 e ômega-6 endogenamente por meio de processos enzimáticos de alongamento e dessaturação (CALDER e DECKELBAUM, 1999).

Dentre os ômega-3 originados a partir do ácido alfa-linolênico estão o ácido docosahexaenóico (DHA) e o ácido eicosapentaenoico (EPA). O DHA representa cerca de 30% dos ácidos graxos totais do córtex cerebral (GUESNET e ALESSANDRI, 2011). Esse ácido graxo é principalmente encontrado esterificado na posição R2 nos fosfolipídios de membrana (Figura 3).

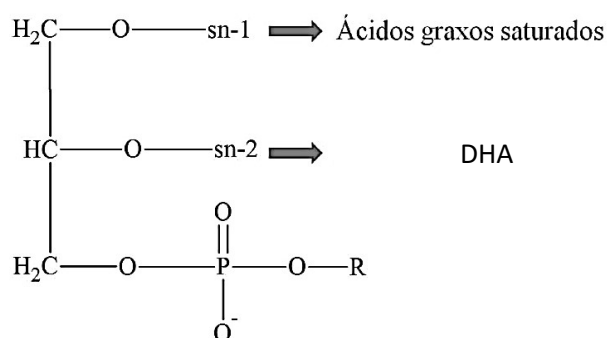


Figura 3. Representação da estrutura de um fosfolípido com um DHA esterificado na posição sn-2. Fonte: file:///C:/Users/DESKTOP/Downloads/TeseCorrigidaPriscillaBentoDerogis.pdf modificado.

Por ser um ácido graxo com alto nível de insaturação, o DHA apresenta papel muito importante na manutenção da fluidez de membrana, o que facilita os processos de excitabilidade transmembrana. Além disso, quando neurônios são estimulados por neurotransmissores, os ácidos graxos poli-insaturados podem se liberar dos fosfolípidios da membrana. Estes ácidos graxos podem ser metabolizados e dão origem aos eicosanóides, uma série de produtos ativos que inclui prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos e uma variedade de hidroxí e hidroperoxi ácidos graxos. Esses compostos agem no sistema nervoso podendo influenciar na neuromodulação e plasticidade sináptica (FONTAN et al., 2005).

A taxa de conversão do ácido alfa-linolênico em DHA é baixa diante da necessidade orgânica desse ácido graxo, sendo aconselhado o consumo de alimentos que contenham moléculas de DHA para suprir adequadamente sua demanda orgânica. Os peixes e os óleos de peixe são ricas fontes de DHA e EPA, principalmente os proveniente de peixes que habitam águas geladas e se alimentam de algas, fonte de ácido alfa-linolênico (HARBEBY et al., 2012).

In vivo, os ômega-3 AGPI podem existir livres como produto da hidrólise enzimática, ligado a fosfolípidios ou a triglicerídeos. Estudos vêm mostrando que os AGPIs da dieta são preferencialmente incorporados pelos fosfolípidios em comparação com sua associação a triglicerídeos (BALOGUN, et al., 2013).

O DHA e o EPA passam com facilidade pela barreira hematoencefálica e são incorporados aos fosfolipídios da membrana dos neurônios (OUELLET et al., 2009). Diante do exposto, fica evidente que a dieta é um fator ambiental chave que influencia a estrutura e função do sistema nervoso (BOURRE, 2009).

O conteúdo de DHA em membranas cerebrais é de importância crucial para o desenvolvimento ideal das funções cerebrais. Estudos indicam que níveis reduzidos de DHA no cérebro são acompanhados por *déficit* de aprendizagem e alterações de humor relacionadas à deficiências nos processos de neurotransmissão (HARBEBY et al., 2012; FONTANI et al. 2005). Como visto nas seções anteriores, os ácidos graxos insaturados aumentam a fluidez da membrana. Desta forma, alterações na incorporação de DHA e EPA podem causar prejuízo nas propriedades físico-químicas da membrana neuronal por alterarem a composição dos fosfolipídios, prejudicando os processos de sinalização.

Por alterar as propriedades físico-químicas da membrana, a deficiência dos níveis de DHA pode ainda afetar significativamente a atividade das proteínas inseridas nessa membrana, podendo assim, alterar o funcionamento de enzimas ligadas à membrana, canais iônicos, receptores, bomba de sódio e potássio, proteína quinase-C e outras enzimas relacionadas com a transdução de sinal (HORROCKS; FAROOQUI, 2004). Além desses efeitos, as dietas com AGPIs reduzem a concentração de colesterol ligada à membrana neuronal, que em excesso, diminui a fluidez desta última (HORROCKS; FAROOQUI, 2004).

Por outro lado, estudos recentes revelam que o consumo excessivo de AGPIs ômega-3 não estão isentos de riscos. Ácidos graxos de cadeia longa usados nas dietas, como AGPIs ômega-3, são mais propensos à oxidação, produzindo metabólitos potencialmente deletérios, como o 4-hidroxi-2-hexenal (4-HHE), um produto final da oxidação de ômega-3, que pode favorecer o estresse oxidativo metabólico e processos inflamatórios crônicos (AWADA et al., 2012, 2013). Quantidades desses AGPIs superiores a 1% das calorias na dieta podem tornar-se um fator de risco em decorrência do aumento da susceptibilidade à oxidação do LDL e estresse oxidativo de outras lipoproteínas (FRANKEL, 2014; SILVA VG, 2015).

2.3 Importância do colesterol na função cerebral

Os animais são capazes de sintetizar colesterol, e essa síntese se dá em grande parte no retículo endoplasmático dos hepatócitos, de onde é distribuído as demais partes do organismo, de acordo com a demanda orgânica. Todas as células do organismo são capazes de incorporar colesterol, e dentre suas múltiplas funções na membrana plasmática dessas células, é importante na manutenção da estrutura dessa membrana. Desta forma, o folheto externo da membrana plasmática troca colesterol constantemente com o plasma. Porém, o metabolismo do colesterol no cérebro é independente dos tecidos periféricos, pois as células do sistema nervoso central apresentam mecanismos próprios para síntese do colesterol necessário para seu funcionamento adequado. A molécula de colesterol presente na corrente sanguínea não consegue transpor diretamente a barreira hematoencefálica, mas sua forma hidroxilada, 24-hidroxicolesterol, catalisada pela enzima 24-hidroxilase, torna possível essa transposição.

Apesar dos neurônios apresentarem capacidade de síntese de colesterol, são os astrócitos as principais células produtoras e fornecedoras de colesterol para o sistema nervoso. Essas células secretam apolipoproteínas E (ApoE's), que carregam as moléculas de colesterol e se ligam a receptores específicos nos neurônios. Dessa forma, as ApoEs se ligam e transportam o colesterol para suprir a necessidade do tecido nervoso. Entre essas necessidades está inclusa a manutenção dos níveis ótimos de colesterol na membrana plasmática dos neurônios e de células gliais formadoras da bainha de mielina afim de modular a fluidez da membrana (MARTÍN, PFRIEGER e DOTTI, 2014).

O colesterol corresponde a cerca de 20% dos lipídios da bainha de mielina. Esse lipídio é particularmente concentrado nos *rafts* lipídicos, que são microdomínios constituídos pela associação de colesterol e esfingolipídios localizados na camada externa da bicamada lipídica. O colesterol confere a membrana menor fluidez, dessa forma, os *rafts* são regiões que apresentam fluidez diferenciada das demais regiões membranares, funcionando como jangadas lipídicas para aporte de algumas proteínas (Figura 4).

Essas plataformas lipídicas são essenciais na membrana plasmática para o tráfego e função de algumas proteínas e para os complexos de sinalização celular. Provavelmente esses microdomínios fornecem localização às proteínas da membrana para promover sinalização em cascata localizada (DOUGANIUC, 2001). Se as jangadas são desfeitas, as proteínas das cascatas sinalizadoras podem desacoplar-se, perdendo sua função. Certas proteínas membranares só são ativas quando associadas aos *rafts*. Há evidências que os receptores pós-sinápticos acumulam-se nos *rafts* lipídicos, sendo abundantemente encontrados nos dendritos de neurônios hipocampais em cultura (HERIN et al., 2003).

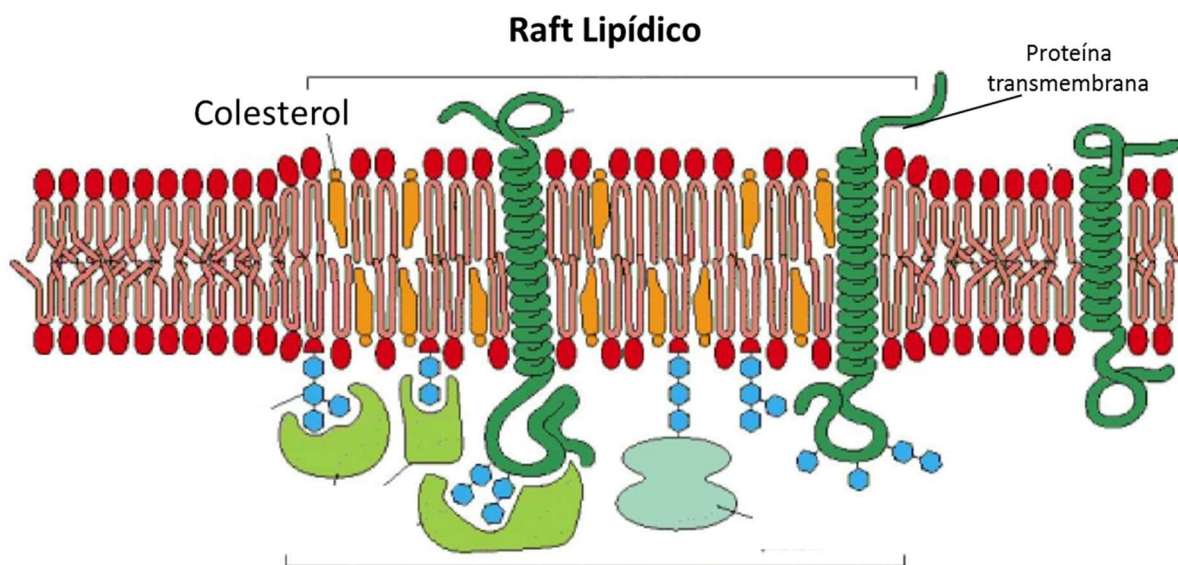


Figura 4. Representação da estrutura de uma jangada (*raft*) lipídico. Fonte: <http://www.mpipks-dresden.mpg.de/~manoj/res.html>

Entretanto, o colesterol não é apenas um componente estrutural essencial para a membrana celular e bainha de mielina, é também um componente essencial na fisiologia neuronal, sendo necessário para a transmissão sináptica (GÖRITZ et al, 2005). Estudos indicam que o colesterol secretado pelos astrócitos controla a sinaptogênese. Trabalhos *in vitro*

mostraram que a formação de sinapses foi reduzida quando a síntese de colesterol foi bloqueada ou quando os astrócitos foram removidos. Nesse mesmo experimento, quando o colesterol foi acrescentado no meio contendo neurônios e astrócitos o número de sinapses voltou a aumentar (BARRES, 2001).

A diminuição dos níveis de colesterol no SNC ainda pode ocasionar redução da densidade sináptica, alargamento da sinapse, perda de sinapses excitatórias e inibitórias e de ramificações dendríticas (HERING et al., 2003). Por outro lado, o excesso de colesterol pode diminuir a fluidez das membranas plasmáticas das células nervosas, dificultando a geração e propagação de impulsos nervosos, diminuindo a excitabilidade neuronal. Além disso, defeitos no metabolismo do colesterol no cérebro vêm sendo relacionados com doenças neurodegenerativas, tais como doença de Alzheimer, doença de Huntington, doença de Parkinson e *déficit* cognitivo (ZHANG e LIU, 2015).

2.4 Dietas hiperlipídicas

A obesidade cresce de forma acelerada, sendo considerada a “epidemia global do século XXI” pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (SVERDLOFF, 2002), pois afeta cerca de 320 milhões de pessoas em todo o mundo e 40% dessas pessoas vivem em países desenvolvidos. Entre as principais causas da obesidade se destaca a alimentação rica em gorduras e açúcares, que está cada vez mais substituindo a alimentação saudável. A vida moderna exige agilidade e praticidade, o que leva muitas pessoas a consumir alimentos de “*fast-foods*”, que para apresentarem-se mais atrativos são enriquecidos com açúcares e gorduras, principalmente colesterol e gorduras saturadas. Esse tipo de alimentação já é preferência entre a maioria dos jovens e de alguns adultos.

As dietas hiperlipídicas oferecem quantidades de calorias mais elevadas que as recomendadas pelos nutricionistas, aumentando o risco de desenvolver obesidade. Outra consequência da alimentação com excesso de gorduras saturadas é o aumento nos níveis séricos de colesterol total, principalmente o

LDL e triglicerídeos (FEOLI, 2003). Por outro lado, dietas saudáveis que contenham gordura insaturada, como os ômega-3, são consumidas em menor quantidade. Dietas ricas em ômega-3 são capazes de diminuir os níveis de colesterol e triglicerídeos, diminuindo os riscos causados pelos elevados níveis de lipídios na corrente sanguínea.

A obesidade vem sendo relacionada a processos inflamatórios no hipotálamo. Essa estrutura, dentre outras funções, é responsável pela regulação da fome e da termogênese. A ingestão de ácidos graxos saturados de cadeia longa desencadeia um processo inflamatório no hipotálamo podendo levar a apoptose e gliose. Esse processo causa anomalias no controle da ingestão calórica e gasto energético (BERKSETH et al., 2014). Devido ao processo inflamatório, o hipotálamo deixa de receber sinais de saciedade adequadamente e assim a pessoa come cada vez mais, podendo levar a obesidade.

A leptina é uma substância secretada pelo tecido adiposo branco de forma proporcional a massa desse tecido. Essa substância possui receptores no hipotálamo estabelecendo um sistema homeostático através de retroalimentação negativa que modula, através de circuitos neuronais, a massa de tecido adiposo. Nas pessoas com obesidade foi verificado que não houve alterações nos níveis sanguíneos de leptina, fortalecendo a hipótese que a falha no mecanismo de saciedade estava relacionada a receptores hipotalâmicos (CINTRA, et al., 2012).

Além disso, o excesso de colesterol presente nessas dietas hiperlipídicas vem sendo relacionado como fator de risco para o desenvolvimento da doença de Alzheimer, enfermidade relacionada à degeneração do sistema nervoso (KOUDINOV et al., 2001). O consumo dessas dietas junto ao consumo deficiente em ômega-3 aumenta os riscos no desenvolvimento de *déficit* cognitivo e doenças neurodegenerativas. Apesar do colesterol da dieta e do produzido pelos tecidos periféricos não conseguir transpor a barreira hematoencefálica, este pode ser convertido em 24S hidroxicolesterol (24-OHC) através de reações enzimáticas, podendo, desta forma, atravessar a

barreira hematoencefálica ou ser trazido do plasma via fluido cerebrospinal (MARTÍN, PFRIEGER e DOTTI, 2014).

Diante da evidente importância do conteúdo lipídico no SNC para execução de suas funções e a influência da proporção e qualidade desse conteúdo no funcionamento normal deste órgão, é coerente que alterações nos níveis lipídicos, ao alterar a fluidez das membranas, alterem também a geração e propagação de impulsos nervosos, modificando consequentemente a atividade elétrica cerebral.

2.5 Atividade elétrica cerebral

O encéfalo é um sistema complexo, formado por uma rede de cerca de 100 bilhões de neurônios e cada uma dessas células pode estar conectada a cerca de 10.000 outros neurônios através de sinapses. Essas células trocam a todo tempo informação em forma de impulsos elétricos, gerando uma atividade elétrica cerebral (LENT, 2004).

A atividade elétrica cerebral é gerada por dois tipos de biopotenciais (BUTTON, 2000): O potencial pós-sináptico, que é uma alteração no potencial de membrana pós-sináptica, gerado pelo resultado final da ação do neurotransmissor, que transforma o sinal químico em elétrico (LENT, 2004); e o potencial de ação, que é gerado pela transmissão de impulsos eletroquímicos através do axônio.

Os potenciais pós-sinápticos são os que mais contribuem para os registros da atividade elétrica cortical (LOPES, 1987), pois tem duração de vários milissegundos e, enquanto durar, esses potenciais podem continuar excitando o neurônio, fazendo com que este transmita uma sequência de impulsos elétricos de saída (GUYTON, 2002). Enquanto os potenciais de ação pouco contribuem com o registro da atividade elétrica cortical, uma vez que são assíncronos, de curta duração e se apresentam em direções ortogonais à superfície do escalpo (BUTTON, 2000; LOPES, 2005).

A atividade elétrica registrada no eletroencefalograma (EEG) e eletrocorticograma (ECoG) corresponde desta forma, à variação dos potenciais

pós-sinápticos de neurônios de uma determinada área, próxima ao eletrodo de captação do sinal eletroencefalográfico, somados espacial e temporalmente (COCKERELL e SHORVON, 1997; BUTTON, 2000; LOPES, 2005; CAPERELLI, 2007).

2.6 Eletroencefalograma (EEG) e eletrocorticograma (ECoG)

O EEG e o ECoG registram os potenciais de membrana resultantes das transmissões sinápticas, em especial dos potenciais pós-sinápticos. Desta forma, o EEG é o resultado do somatório espacial e temporal da atividade de milhares ou milhões de neurônios disparando sincronicamente, capturado em uma determinada região próxima ao eletrodo. Através do eletroencefalograma pode-se avaliar se a atividade elétrica cerebral encontra-se dentro do padrão de normalidade, ou detectar disfunções geradas por tumores ou focos epiléticos, localizando-os com precisão (SILVA e COSTA, 1998).

O EEG é realizado através de um aparelho apropriado, o eletroencefalógrafo, que registra a atividade elétrica cerebral. Eletrodos são dispostos no escalpo do paciente e conectados a um amplificador de corrente elétrica que aumenta a amplitude do sinal elétrico do cérebro milhares de vezes. O amplificador é ligado a um computador, no qual as oscilações da corrente elétrica são digitalizadas, podendo ser analisadas pelo médico ou pesquisador (SANTOS, 2007).

No ECoG, a aquisição do sinal elétrico é semelhante ao do EEG, porém enquanto o EEG é um exame não invasivo, no ECoG os eletrodos são dispostos diretamente no córtex cerebral. O ECoG é utilizado quando se deseja analisar a atividade elétrica diretamente do córtex. Tanto o EEG quanto o ECoG registram a voltagem em função do tempo, originando uma série temporal (SANTOS, 2007).

Doenças neurológicas que interfiram na atividade elétrica cerebral, também podem causar alterações nos padrões das ondas cerebrais, podendo essas alterações serem reveladas por exames encefalográficos. A epilepsia é uma das principais doenças neurológicas e o EEG é o exame mais utilizado em

seu diagnóstico. A epilepsia de mioclonia juvenil, por exemplo, pode apresentar em seu EEG paroxismos de complexos espícula-onda de projeção generalizada associada com a doença. (Figura. 5).

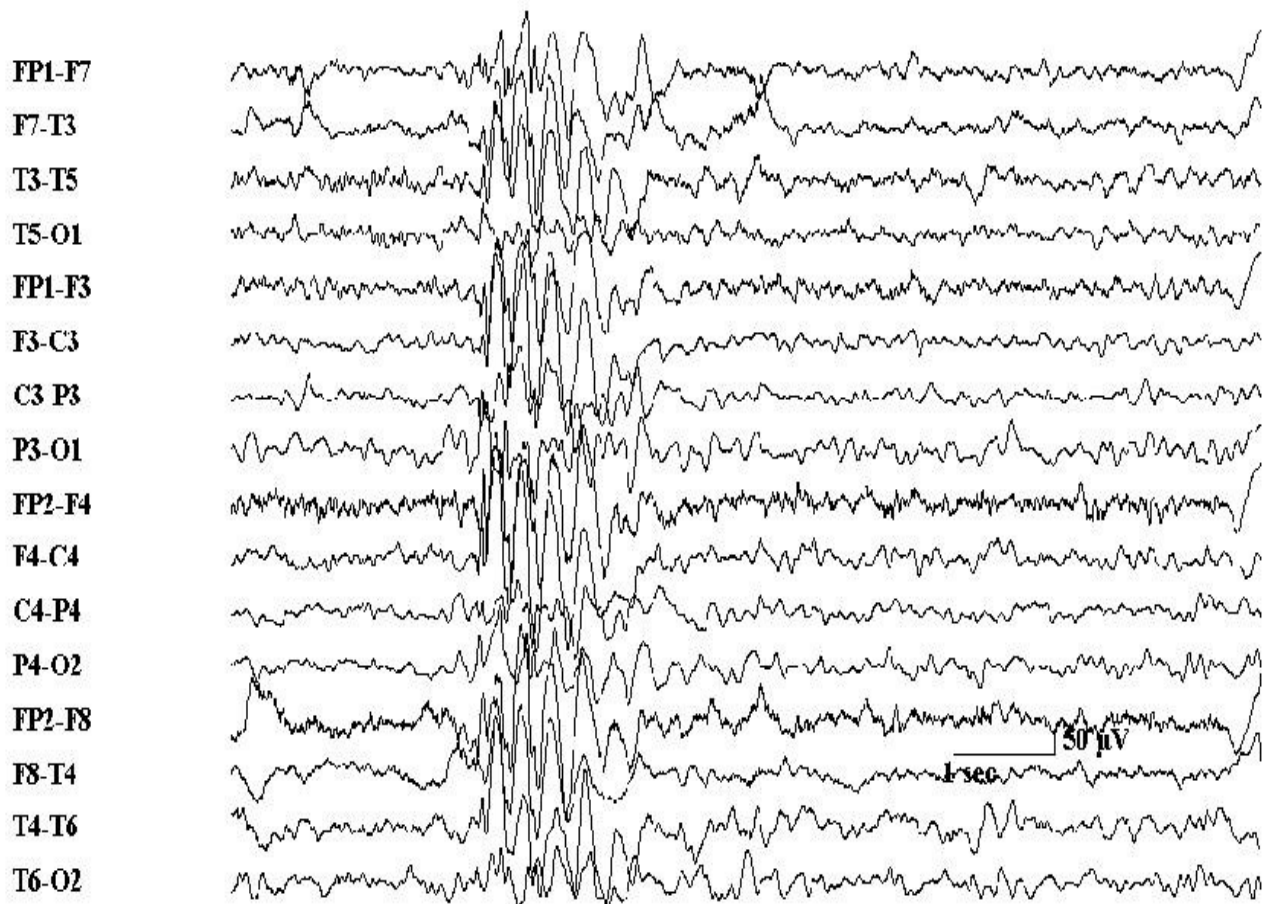


Figura 5. Eletroencefalograma demonstrando descargas de espícula-onda generalizadas em paciente com epilepsia de mioclonia juvenil. Fonte: <http://emedicine.medscape.com/article/1138154-overview>

2.7 Diferentes ondas cerebrais

O registro encefalográfico apresenta uma aparente aleatoriedade. Entretanto, permite identificar padrões de ondas distintos que ocorrem de acordo com o funcionamento cerebral. Dependendo do nível de consciência, o exame encefalográfico apresenta diferentes ritmos de ondas, provocando

alterações no espectro de frequência. Existem vários tipos de ondas cerebrais, porém as mais comuns e as situações em que prevalecem são: ondas delta (0,5-4Hz) em sono profundo; teta (4-8Hz) em sonolência ou estados emocionais alterados; alfa (8-14Hz) em vigília com relaxamento mental; e beta (14-30Hz) em atividade física ou mental específica e estados de tensão (NIEDERMEYER, 2005; GUYTON, 2002) (Figura 6). Um registro de ECoG pode conter todas essas frequências, contudo terá a maior predominância de um tipo de onda de acordo com o nível de consciência.

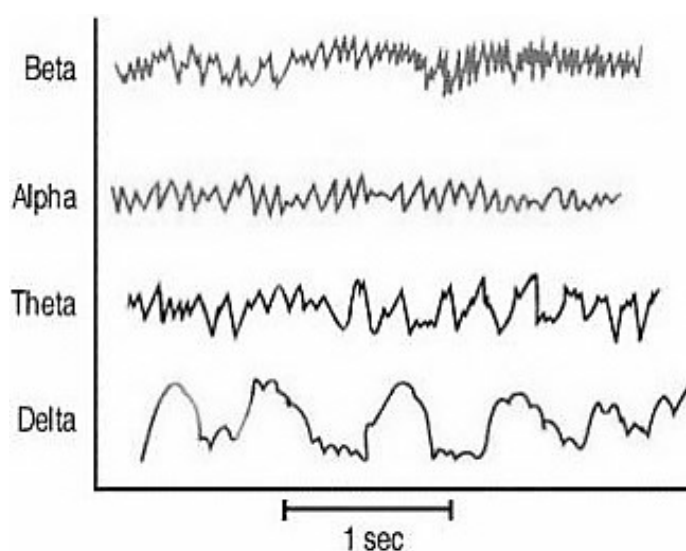


Figura 6. Ondas cerebrais obtidas a partir de um registro de ECoG em ratos. Ondas beta (12-30 Hz) - em atividade física ou mental específica e estados de tensão, além de estar relacionada ao processo de cognição. Ondas alfa (8-12 Hz) - em vigília com relaxamento mental. Ondas teta (4 - 8 Hz) - em sonolência ou estados emocionais alterados. Ondas delta (1 - 4 Hz) - em sono profundo. Fonte: http://www.neuroterapia.com.br/crbstbrainwaves_5B1_5D.jpg?v=264h3s5cwqdb1td

2.8 Epilepsia – Breve histórico e atualidades

O termo epilepsia deriva do verbo grego *epilambanein*, que significa ser atacado, dominado ou possuído. As primeiras referências à epilepsia datam de 2000 a.C. na antiga Babilônia, um texto escrito em papiro descrevia uma crise convulsiva, atribuindo à epilepsia caráter espiritual. Por muito tempo se atribuiu caráter sobrenatural a epilepsia, considerando-a castigo ou possessão por espíritos divinos ou malignos. Hipócrates, cerca de 400 a.C. e Galeno 175 d.C.

afirmaram que a epilepsia não era vinculada a espiritualidade, mas a problemas no cérebro, tentando desmistificar a ideia de doença sagrada. Porém, as afirmações não foram suficientes para a mudança de concepções, fazendo com que o estigma espiritual da epilepsia perdurasse por séculos (REYNOLDS, 1996).

Na Idade Média, mais especificamente no período da santa inquisição, a epilepsia foi relacionada à bruxaria, o que fez com que os epiléticos fossem perseguidos e candidatos às fogueiras. No século XVIII começaram a surgir ideias contestando esse caráter sobrenatural atribuído à epilepsia. Mas foi no século XIX, sob a marca do positivismo, que o estudo das ciências biológicas mais avançou, o que repercutiu nos estudos das patologias cerebrais, dentre elas as doenças psiquiátricas e a epilepsia. Como consequência desse momento, houve um crescimento significativo do sistema hospitalar psiquiátrico (MOREIRA, 1996).

O estudo da epilepsia se desenvolveu atrelado ao de doenças psiquiátricas, sendo relacionada à insanidade. Porém o estigma em relação ao epilético era tão marcante que alguns asilos, ao considerarem negativos os prognósticos dos portadores de epilepsia, não os aceitavam. Todavia, ao passo que a ciência médica avançava, deixavam-se rastros que sedimentava o estigma da loucura aos epiléticos (MOREIRA, 1996). Dentre os nomes que merecem destaque nesse período está o do inglês Hughlings Jackson (1835-1911), ele afirmou sobre a epilepsia que “Convulsões e outros paroxismos são devidos a descargas nervosas súbitas, excessivas e temporárias”, conceitos que se mantêm atuais (ENGELHARDT, 2014).

Atualmente, epilepsia é caracterizada como uma desordem da atividade elétrica cerebral que ocorre de forma espontânea e recorrente (CUKIERT, 2006), está se trata da enfermidade neurológica mais comum, acometendo cerca de 1% da população mundial, com maior incidência em países subdesenvolvidos (DIOP et al., 2003). A epilepsia de maior incidência em humanos é a epilepsia do lobo temporal (ELT), com cerca de 40 a 50% dos casos. Esta merece atenção especial por apresentar alto índice de

refratariedade a tratamentos medicamentosos, cerca de 40 % (ENGEL, 2001). Esta condição patológica pode ser desencadeada a qualquer momento da vida, mas as crises são mais frequentes em crianças e idosos (CUKIERT, 2006).

As causas da epilepsia são bastante variadas, podendo ocorrer em função da predisposição genética, chamadas idiopáticas ou primárias; ou por prévias agressões que causam lesões neuronais bem definidas, que provavelmente provocam uma reorganização dos circuitos cerebrais, tornando-se foco de descargas elétricas. Essa última é chamada de secundária ou adquirida. Tais agressões que culminam em uma lesão cerebral podem ser de ordem infecciosa, inflamatória, metabólica, neoplásica, tóxica, traumática ou mesmo por um *status epilepticus* prolongado (ENGEL, 2006).

As manifestações clínicas da epilepsia podem ser físicas, como crises convulsivas ou crises de ausência; ou psíquica, como *déficit* neurológico permanente e a disfunção intelectual (FISHER et al., 2005).

As crises epiléticas podem ser classificadas como parciais ou generalizadas. As crises parciais apresentam foco epileptogênico, funcional ou anatômico, identificável nos registros eletrográficos, podendo essa modalidade de crise evoluir para uma crise generalizada (COCKERELL e SHORVON, 1997). As crises generalizadas envolvem os dois hemisférios cerebrais, sem que seja possível a identificação de um foco anatômico ou funcional.

As crises parciais ainda se subdividem em simples ou complexas. Nas crises parciais simples não há comprometimento da consciência. As crises parciais complexas apresentam basicamente três componentes: aura, alterações de consciência e automatismos. Já nas crises generalizadas a consciência é seriamente comprometida, podendo ser manifestada de duas formas: crise de ausência ou tônico-clônica (COCKERELL e SHORVON, 1997).

O diagnóstico de epilepsia é determinado pela manifestação clínica da doença junto à observação da ocorrência de ondas epileptiformes anormais em registros eletrográficos, podendo, em alguns poucos casos, pacientes apresentarem EEG característico da doença sem nunca terem sofrido

manifestações clínicas, ou apresentarem convulsões (OLIVEIRA e ROSADO, 2004).

2.9 Epilepsia do lobo temporal

A epilepsia do lobo temporal (ELT) é a forma mais comum de crise parcial complexa no indivíduo adulto. As principais estruturas relacionadas à ELT são do sistema límbico, em especial o hipocampo e a amígdala, essas são importantes no controle das atividades emocionais, além de estarem relacionadas à memória e aprendizagem, respectivamente. Portanto, portadores da ELT podem apresentar tais funções seriamente comprometidas.

Na ELT pode haver morte neuronal seguida de gliose, causando atrofia hipocampal. Esta alteração é denominada esclerose mesial temporal. Provavelmente, essa esclerose na ELT é a principal responsável pela elevada refratariedade a medicamentos (COSTA et al., 1998; GUERREIRO et al., 2000; YACUBIAN, 2004).

2.10 Modelo experimental da pilocarpina

Os modelos animais têm auxiliado no entendimento da epilepsia em humanos. Alguns trabalhos atestam que a lesão cerebral do lobo temporal em ratos induzida pela pilocarpina torna o animal em estado epilético crônico, reproduzindo alterações clínicas, eletrográficas, bioquímicas, farmacológicas e histológicas, em condições semelhantes à de humanos portadores de ELT (LEITE et al., 1990; MELLO et al., 1993; CAVALHEIRO et al., 1996; MATHERN et al., 1996; PRIEL et al., 1996; ARIDA et al., 1999; LI et al., 2003).

A pilocarpina é um agonista colinérgico muscarínico (TURSKY et al., 1989) que age aumentando a neurotransmissão excitatória colinérgica (PERSINGER et al., 1988), provocando crises límbicas ininterruptas (CLIFFORD et al., 1987). A ideia aceita, com base em estudos experimentais, é que a ativação do sistema colinérgico ative os neurônios excitatórios glutamatérgicos, dando início ao *status epilepticus*. A liberação sináptica

excessiva de glutamato apresenta efeito excitotóxico, mantendo a célula despolarizada, o que aumenta o influxo de cálcio no neurônio levando a morte celular (CHOI et al., 1987).

O efeito excitotóxico do excesso de glutamato, provocado pela pilocarpina, gera a morte neuronal nas regiões CA1, CA2, CA3 e no giro denteado da formação hipocampal. Desta forma, o *status epilepticus* e a morte neuronal não se dá pelo efeito tóxico da pilocarpina, mas sim pelo excesso na liberação de glutamato que ela provoca. Essa condição é semelhante à que ocorre em pacientes com epilepsia. A morte de interneurônios gabaérgicos, neurônios inibitórios, no hipocampo vem sendo apontada como uma das principais causas da hiperexcitação sincrônica gerada pelo modelo crônico da pilocarpina (FERRARI et al., 2008).

O modelo da pilocarpina apresenta três fases de acordo com suas manifestações clínicas: a fase aguda, latente e crônica. A fase aguda tem início logo após a administração da pilocarpina e tem duração aproximada de 8 a 12h; nesse período ocorre o *status epilepticus* e o animal apresenta crises convulsivas ininterruptas. A fase de latência é posterior à fase aguda, tem duração aproximada de 4 a 14 dias. Nessa fase há ausência de manifestações físicas. A última fase é a crônica, período em que o animal começa a apresentar crises espontâneas e recorrentes, com frequência oscilando de 2 a 3 episódios por semana (PRIEL, 1996).

2.11 Ictogênese: o início das manifestações epileptiformes

Na ictogênese há uma elevada despolarização paroxística sincrônica dos neurônios, o que ocasiona uma hiperatividade neuronal. Isso culmina em descargas elétricas que na epilepsia são espontâneas e recorrentes, causando desordem na atividade cerebral. Essa desordem normalmente é percebida no eletroencefalograma EEG. O que provavelmente ocorre na ictogênese é um desequilíbrio entre os fatores excitatórios e inibitórios cerebrais, como na liberação de glutamato e GABA (ácido gama-amino butírico), respectivamente

(BRADFORD, 1995). Esse desequilíbrio pode ser analisado em nível de membrana celular, de neurônios e da rede neuronal.

Alterações no mecanismo de manutenção do potencial de membrana podem desencadear atividade ictal. Os carreadores presentes nos astrócitos e a bomba de sódio e potássio podem elevar o nível de potássio extracelular, o que induz à despolarização neuronal gerando desordem no potencial de membrana. Anomalias nos canais de sódio também podem acarretar numa diminuição no limiar de disparo neuronal, sendo outro exemplo de alteração nesse potencial capaz de gerar manifestações epileptiformes (SILVA e CABRAL, 2008). Alterações plásticas no cérebro também podem contribuir no processo de epileptogênese e ictogênese. O brotamento colateral de axônios em neurônios excitatórios é um exemplo desse tipo de plasticidade (SILVA e CABRAL, 2008).

2.12 Dietas terapêuticas rica em lipídios

Dietas ricas em lipídios e pobres em carboidrato vêm sendo utilizadas no tratamento para a epilepsia refratária a medicamentos convencionais. Como exemplo dessas dietas pode-se citar a dieta cetogênica (NORDLI jr et al, 1997; NORDLI, 2002) e a Dieta Atkins (KOSSOFF, 2004). O mecanismo pelo qual as dietas protegem os pacientes das crises convulsivas ainda é desconhecido, mas a hipótese mais difundida é que a ação antiepiléptica seja decorrente da produção de corpos cetônicos e que estes alteram o metabolismo cerebral (STAFSFROM et al, 2000; KOSSOFF, 2004).

A diminuição da glicose sanguínea causada pelo jejum ou dieta hiperlipídica faz com que o organismo ao invés da glicose utilize a fonte de energia advinda do tecido adiposo, liberando ácidos graxos precursores dos corpos cetônicos. Esses corpos cetônicos são capazes de transpor a barreira hematoencefálica diminuindo a excitabilidade no cérebro (NORDLI, 1997). Estudos têm sugerido que o efeito protetor da cetose advém de um aumento dos níveis de GABA nos terminais nervosos (KOSSOFF, 2004).

A dieta cetogênica é a mais estudada e utilizada no controle da epilepsia refratária. Essa dieta apresenta níveis baixos de carboidrato, moderado de proteína e elevado de lipídios. A proporção mais recomendada é de 4 (gordura/proteínas): 1 (carboidratos). Porém, podem-se utilizar proporções menores como 3:1, 2:1 (INUZUKA-NAKAHARADA, 2008). A recomendação é que essa dieta seja realizada após jejum (FREEMAN et al., 2007). Entretanto, estudos têm questionado a eficácia do jejum, sugerindo que este seja desnecessário para o sucesso do tratamento com a dieta cetogênica (RIZZUTTI et al., 2007).

Essas dietas terapêuticas aplicadas no tratamento da epilepsia têm como requisito, além da maior inclusão de lipídios, a diminuição drástica de carboidratos e são precedidas de jejum de ao menos 24 horas. Porém, a dieta utilizada neste estudo se baseou apenas no acréscimo de gordura animal, sem que houvesse limitação no consumo de carboidratos e jejum prévio, o que a torna mais próxima da dieta hiperlídica de hábito cultural. Para que, desta forma, fosse possível a análise das possíveis consequências do aumento cultural no consumo de gorduras na alimentação. A escolha da utilização de gordura animal nesse estudo foi devido a sua grande quantidade de colesterol, diferente das gorduras de origem vegetal.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Analisar o efeito da suplementação lipídica saturada e insaturada na atividade elétrica cerebral basal e durante o *status epilepticus* de ratos.

3.2 Objetivos específicos

1. Verificar peso e níveis séricos de triglicerídeos e colesterol total de ratos suplementados com ômega-3 e ratos alimentados com dieta hipercolesterolêmica;
2. Analisar o efeito da suplementação de ômega-3 e da dieta hipercolesterolêmica na atividade elétrica cerebral basal de ratos.
3. Analisar o efeito da suplementação de ômega-3 e da dieta hipercolesterolêmica na atividade elétrica cerebral de ratos em *status epilepticus*.

4 . MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados 56 ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*, var. *albinus*), dos quais, 30 foram destinados a histologia e 26 destinados a eletrofisiologia. Os animais foram provenientes do biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, local onde foram realizados os ensaios biológicos. Os animais foram mantidos em ambiente adequado com temperatura ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade controlada, em ciclo claro-escuro de 12 horas, com água e alimentação *ad libitum*. Os procedimentos foram realizados de acordo com as normas do Comitê de Ética no Uso de Animais (licença nº 103/2014 – CEUA/ UFRPE).

4.1 Desenho experimental

4.1.1 Desenho experimental para análise histológica

Os animais foram divididos em seis grupos: Grupo 1 (n=5), animais que se alimentaram apenas da dieta padrão de laboratório (ração comercial Presence® 7883). Grupo 2 (n=5), animais que se alimentaram apenas da dieta padrão de laboratório e submetidos ao *status epilepticus* por 4h. Grupo 3 (n=5), animais que se alimentaram com a ração padrão de laboratório e foram suplementados com óleo de peixe dos 60 aos 120 dias. Grupo 4 (n=5), animais que se alimentaram com a ração padrão de laboratório e foram suplementados com óleo de peixe dos 60 aos 120 dias e submetidos ao *status epilepticus* por 4h. Grupo 5 (n=5), animais que receberam dieta hipercolesterolêmica dos 60 aos 120 dias. Grupo 6 (n=5), animais que receberam dieta hipercolesterolêmica dos 60 aos 120 dias e submetidos o *status epilepticus* por 4h (Figura.7).

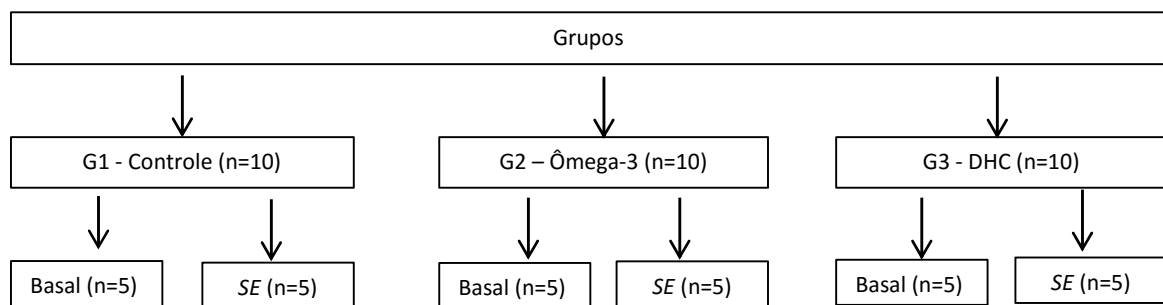


Figura 7. Organograma mostrando as etapas do delineamento experimental para análise histológica, dos animais: controle (G1), suplementados com ômega-3 (G2) e alimentados com a dieta hipercolesterolêmica (DHC) (G3), com atividade elétrica cerebral basal e durante o *status epilepticus* (SE).

4.1.2 Desenho experimental para eletrofisiologia

Os animais foram divididos em três grupos: Grupo 1 (n=10), animais que se alimentaram apenas da dieta padrão de laboratório. Grupo 2 (n=8), animais que se alimentaram com a ração padrão de laboratório e foram suplementados com ômega-3 dos 60 aos 120 dias. Grupo 3 (n=8), animais que receberam dieta hipercolesterolêmica dos 60 aos 120 dias. Ao atingirem os 120 dias de idade, todos os animais tiveram sua atividade elétrica cerebral registrada antes e durante o *status epilepticus* (Figura. 8).

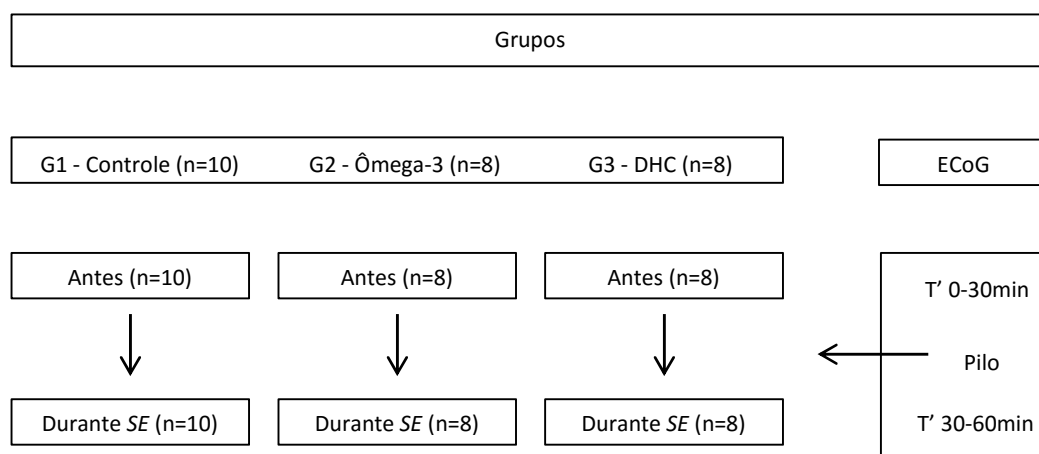


Figura 8. Organograma mostrando as etapas do delineamento experimental para análise eletrofisiológica, dos animais: controle, suplementados com ômega-3 e alimentados com a dieta hipercolesterolêmica (DHC), antes e durante o *status epilepticus* (SE).

4.2 Suplementação com EPA e DHA

A suplementação com ômega-3 foi feita com cápsulas de 1000 mg óleo de peixe Naturallis®, contendo 180 mg de EPA e 120 mg de DHA. O óleo foi administrado por meio de gavagem. Utilizou-se uma agulha de gavagem em aço inoxidável com ponta arredondada, a qual foi introduzida na cavidade oral do animal e gentilmente conduzida até o esôfago.

4.3 Dieta hipercolesterolêmica

A dieta hipercolesterolêmica foi produzida triturando-se a ração comercial Presence® 7883 para ratos (Tabela 1) com o auxílio de um processador e acrescentando-se gordura suína (Sadia®-BRA) fundida na proporção de 30% de gordura para 70% de ração padrão. A ração foi peletizada e mantida refrigerada em recipiente hermeticamente fechado. A tabela 2 apresenta os valores nutricionais da gordura suína de acordo com o fabricante.

Tabela1. Informação nutricional da ração comercial Presence® 7883 para ratos

Componente	Percentual
Umidade (Max)	13,0%
Proteína Bruta (Min)	23,0%
Extrato Etéreo (Min)	4,0%
Matéria Fibrosa (Max)	5,0%
Matéria Mineral (Max)	10,0%
Cálcio (Max)	1,3%
Fósforo (Min)	0,85%

Fonte: SP Rações. Disponível em <http://www.spraco.es.com.br/produto/presence-ratos-e-camundongos/153>.

Tabela 2. Informação nutricional correspondente a 10g de gordura suína

Valor calórico	90 Kcal
Carboidratos	0g
Proteínas	0g
Gorduras totais	10g
Gorduras saturadas	3,9g
Gorduras trans	0g
Colesterol	7,2mg
Fibra alimentar	0g
Sódio	0g

4.4 Provas laboratoriais

Amostras de sangue (0,5 ml) foram coletadas por meio de punção da veia caudal lateral com o auxílio de um cateter venoso Nº 24 em tubos com anticoagulante. As amostras foram utilizadas para análise de triglicerídeos totais e colesterol total. A análise foi realizada com o auxílio do aparelho Accutrend® Plus (Roche) imediatamente após a coleta.

4.5 Procedimentos para análise histológica

Para a análise histológica os animais foram divididos em 4 grupos: Grupo 1: animais normonutridos. Grupo 2: animais normonutridos e submetidos ao *status epilepticus* por um período de três horas. Grupo 3: animais suplementados com ômega-3. Grupo 4: animais alimentados com ômega-3 e submetidos ao *status epilepticus* por um período de 4 horas.

Após aprofundamento anestésico, todos os animais foram perfundidos com solução fisiológica (NaCl 0,9%) e posteriormente, com formaldeído 10% em tampão fosfato (pH 7,4). Os encéfalos dos animais foram coletados e

fixados em solução tamponada de formaldeído 10%. Fragmentos de orientação coronal dos encéfalos foram desidratados em concentrações crescentes de álcool etílico (70% ao P.A.), diafanizados em xilol, impregnados e incluídos em Paraplast Plus®.

Secções do hipocampo foram obtidas utilizando-se um micrótomo rotativo Leica®, com cortes de 4 micrometros, seriados, em um plano coronal, na altura do III ventrículo, equivalente a seccão 21 (Bregma: -1.70 mm e nível 74) de acordo com Paxinos e Watson (2013). Após esse procedimento, os cortes foram corados pela técnica da Hematoxilina-Eosina (H.E.), segundo metodologia descrita por Behmer, Tolosa e Freitas Neto (1976), e com coloração de Cresil Violeta de acordo com LABIOCEL (2006). Fotomicrografias foram obtidas em microscópio de luz Leica® em aumentos de 40X e 400X, com auxílio do software ImageJ® para avaliação histopatológica da região CA1, CA2, CA3, giro denteado e hilo do giro denteado da formação hipocampal.

4.6 Procedimentos para o registro da atividade elétrica cerebral

4.6.1 Procedimento cirúrgico para implante de eletrodo

Aos 115 dias de idade, os animais foram anestesiados com uma associação de cetamina (50 mg) e xilazina (20 mg), na dose de 0,1 mL para cada 100 g de peso, administrada por via intramuscular (MASSONI, 2011). A temperatura corporal foi mantida em torno de $37,5 \pm 1^{\circ}\text{C}$ com o auxílio de um aquecedor elétrico posicionado sob o animal. Após a tricotomia e assepsia do campo cirúrgico a cabeça do animal foi fixada à base de um aparelho estereotáxico (Insight®). Após a fixação da cabeça, foi realizada uma incisão longitudinal da pele na linha média do crânio. Posteriormente, com um auxílio de uma broca odontológica, foram realizados dois orifícios nos quais foram posicionados dois parafuso cirúrgicos sobre o hemisfério esquerdo (Figura 9). Um parafuso foi posicionado na região parietal no córtex sensório-motor, cerca de 1,5 a 2,5 mm anterior e 1 a 2 mm lateral ao bregma, e outro parafuso de mesmo tipo, foi colocado sobre o osso frontal (eletrodo de referência). Para fixação dos parafusos foi usada resina acrílica e após a completa secagem da

resina a pele foi suturada, expondo apenas os parafusos que serviram de eletrodo.

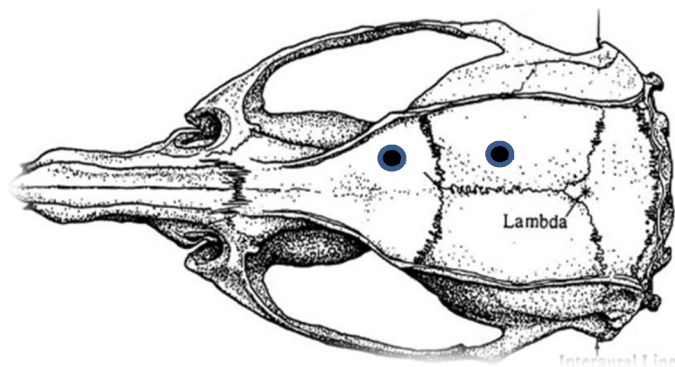


Figura 9. Esquema representativo de um crânio de rato evidenciando locais de fixação dos eletrodos (círculos pretos).



Figura 10. Animal no pós-cirúrgico do implante do eletrodo com antibiótico tópico (Rifamicina).

4.6.2 Registro da atividade elétrica cerebral

Nos cinco dias seguintes à cirurgia, os animais foram tratados com antibiótico tópico. Aos sete dias, período no qual se verificava a completa cicatrização da cirurgia, cada animal teve sua atividade elétrica cerebral registrada por 1 h com um aparelho EMG 410C (EMG System, Brasil) numa taxa de amostragem de 6000 S/s. Durante o registro do ECoG, os animais

foram alocados em uma gaiola de Faraday (PESSOA, 2012). Para cada animal, o ECoG foi obtido por 30 minutos (linha de base). Passados os primeiro 30 minutos, foi administrada pilocarpina intraperitonealmente em uma dose de 350mg/Kg de peso e o registro continuou a ser obtido por mais 30 minutos (*status epilepticus*). Finalizados os registros, os animais foram eutanasiados por meio de aprofundamento anestésico.

4.7 Análise dos registros de ECoG

Os registros do ECoG foram segmentados em janelas de 2 minutos. Esses segmentos foram importados para o programa Matlab 7.8 (Mathworks, Natick, MA, USA), no qual foi implementado o algoritmo para o cálculo do espectro de potência das ondas cerebrais do ECoG.

4.8 Teoria

4.8.1 Transformada de Fourier e espectro de potência

Segundo o teorema de Fourier, todo sinal oscilatório complexo pode ser decomposto em vários outros sinais senoidais com diferentes frequências. É o que acontece com o EEG e ECoG, um sinal complexo que pode ser decomposto em sub-ritmos e representados no domínio da frequência. Depois de decomposto o sinal, pode-se calcular a energia de cada faixa de frequência. A utilização desse teorema torna possível a decomposição de um sinal periódico $f(x)$ nas suas componentes frequenciais com a somatória de termos senos e cossenos harmonicamente relacionados na forma da seguinte expressão (WEISSTEIN, 2004):

$$f(x) = \frac{1}{2}a_0 + \sum_{n=1}^{\infty} (a_n \cos nx + b_n \sin nx)$$

Os coeficientes a_k e b_k são calculados analiticamente através das seguintes integrais (BUTKOV, 1988):

$$a_n = \frac{1}{\pi} + \int_{-\pi}^{\pi} f(x) \cos nx \, dx$$

$$b_n = \frac{1}{\pi} + \int_{-\pi}^{\pi} f(x) \sin nx \, dx$$

Podemos observar na Figura 11a, 11b, 11c e 11d a decomposição do EEG nas suas principais componentes frequências referentes as ondas cerebrais delta, teta, alpha e beta.

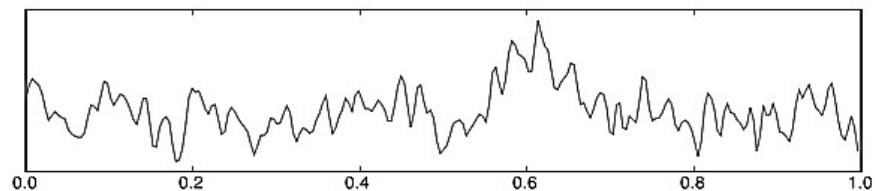


Figura 11a. Sinal de EEG,o qual é a soma de eventos oscilatórios.

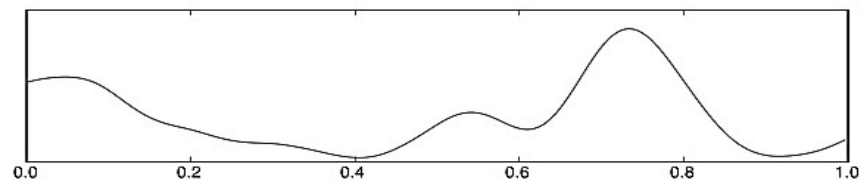


Figura 11b. Ondas delta 0,5-4Hz

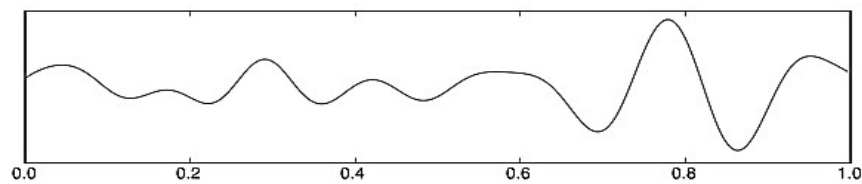


Figura 11c. Ondas teta 4-8Hz

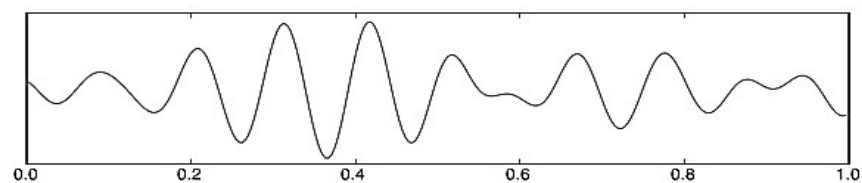


Figura 11d. Ondas alpha 8-14Hz

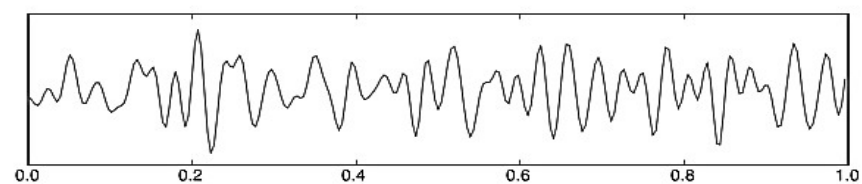


Figura 11e. Ondas beta 14-32 Hz

A Transformada de Fourier (TF) é uma análise direta da série temporal que permite passar a informação no domínio do tempo para o domínio da frequência como se pode observar nas Figuras 12 e 13 para o sinal ECoG, desta forma, torna possível o conhecimento da contribuição de cada componente de frequência presente numa serie temporal.

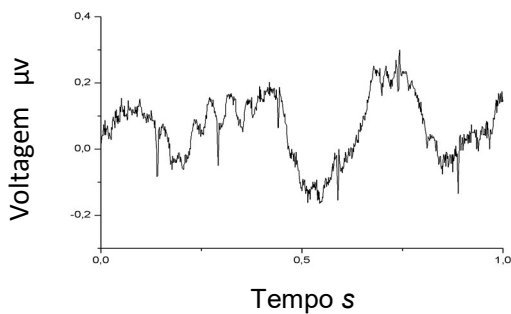


Figura 12. ECoG no domínio do tempo

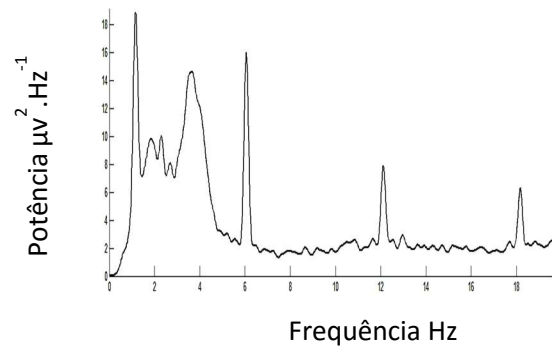


Figura 13. Espectro de potência do ECoG (domínio da frequência)

A TF é calculada a partir da decomposição do sinal complexo oscilatório em suas frequências componentes. A função $F(f)$ é a transformada direta de Fourier da função temporal $F(t)$ e representa as amplitudes das várias frequências de ondas que constituem o sinal $F(t)$. Então, $F(f)$ representa o grau de participação das componentes frequenciais da função $F(t)$, conforme se pode observar na equação a seguir (WEISSTEIN, 2004)

$$F(f) = \int_{-\infty}^{\infty} f(t)e^{-i2\pi ft} dt$$

O quadrado da Transformada de Fourier do ECoG gera seu espectro de potência. A potência média obtida no espectro permite estimar a contribuição dos diferentes ritmos cerebrais no sinal ECoG. Formalmente, o espectro de potência para um sinal eletrofisiológico específico pode ser calculado como segue:

$$\overline{E}_{\omega} = \frac{\int_{f_s}^{f_e} |F(f)|^2 df}{\int_{f_s}^{f_e} df}$$

Onde $F(f)$ é a Transformada de Fourier é do sinal $f(t)$, aqui representado pelo ECoG. $\overline{E}_{\omega}$ é a energia do espectro de potência normalizado por um determinado intervalo de frequência $\omega = [f_s, f_e]$, aqui representado pelos diferentes ritmos (MACHADO et al., 2012).

4.9 Análise estatística

O delineamento estatístico foi realizado utilizando testes não-paramétricos. O teste de Wilcoxon foi utilizado para dados dependentes (pareados) e o teste de Mann-Whitney foi utilizado para as amostras independentes (não pareadas). Os resultados foram expressos através de média $\pm$ desvio padrão. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

REFERÊNCIAS

ARIDA, R. M.; SCORZA, F. A.; PERES, C. A.; CAVALHEIRO, E. A. The course of untreated seizures in the pilocarpine model of epilepsy. **Epilepsy Research**, v. 34. p. 99-107, 1999.

AWADA, M.; SOULAGE, C. O.; MEYNIER, A.; DEBARD, C.; PLAISANCIÉ, P.; BENOIT, B.; PICARD, G.; LOIZON, E.; CHAUVIN, M. A.; ESTIENNE, M.; PERETTI, N.; GUICHARDANT, M.; LAGARDE, M.; GENOT, C.; MICHALSKI, M. C. Dietary oxidized n-3 PUFA induce oxidative stress and inflammation: role of intestinal absorption of 4-HHE and reactivity in intestinal cells. **The Journal of Lipid Research**, v. 53, p. 2069–2080, 2012.

BALOGUN, K. A.; ALBERT, C. J.; FORD, D. A.; BROWN, R. J.; CHEEMA, S. K. Dietary Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids Alter the Fatty Acid Composition of Hepatic and Plasma Bioactive Lipids in C57BL/6 Mice: A Lipidomic Approach. **Ploss one**, v.8(11), p.82399, 2013.

BARRES, B. A.; SMITH, J. Cholesterol – Making or breaking the synapse. **Science**, v. 294. p. 1297-1298, 2001.

BEHMER, O. A.; TOLOSA, E. M. C. & FREITAS NETO, A. G. **Manual de técnicas para histologia e patologia**. 1a ed. Sao Paulo, Edart, 1976.

BERKSETH, K; GUYENET, S. J.; MELHORN, S. J ;LEE, D.; THALER, J. P.; SCHUR, E. A.; SCHWARTZ, M. W. Hypothalamic gliosis associated with high-fat diet feeding is reversible in mice: a combined immunohistochemical and magnetic resonance imaging study, **Endocrinology**, v.155(8), p.2858-67, 2014.

BOURRE, J. M. Brain lipids and ageing. **Food for the Ageing Population**, v. i, p. 347 219–251, 2009.

BRADFORD, H. F. Glutamate, GABA and epilepsy. **Progress in Neurobiology**, v. 47 (6), p. 477-511, 1995.

BRENNA, J. T.; CARLSON, S. E. Docosahexaenoic acid and human brain development: Evidence that a dietary supply is needed for optimal development. 350 **Journal of human evolution**, v. 2014, p. 1–8, 26, 2014.

BUTTON, V. L. S. N. Eletroencefalógrafos e monitores de EEG. In: IA748 Instrumentação Biomédica. Campinas: DEB/FEEC – Unicamp, 2000.

CARLSON, S. J. et al. The role of the ω -3 fatty acid DHA in the human life cycle. **JPEN. Journal of parenteral and enteral nutrition**, v. 37, n. 1, p. 15–22, 2013.

CAVALHEIRO, E. A.; SANTOS, N. F.; PRIEL, M. R. (1996). The pilocarpine model of epilepsy in mice. **Epilepsia**, v.37, p. 1015-1019.

CHATTOPADHYAY, A.; PAILA, Y. D. Lipid–protein interactions, regulation and dysfunction of brain cholesterol. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.354, p.627–633, 2007.

CHOI, D. W., Mauluccigedde M & Kriegstein AR (1987). Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. **Journal of Neuroscience** 7, 357-368.

CINTRA, DENNYS E ; ROPELLE, EDUARDO R ; MORAES, JULIANA C ; PAULI, JOSÉ R ; MORARI, JOSEANE ; DE SOUZA, CLAUDIO T ; GRIMALDI, RENATO ; STAHL, MARCELA ; CARVALHEIRA, JOSÉ B ; SAAD, MARIO J ; VELLOSO, LICIO A ; KOWALTOWSKI, ALICIA. J Unsaturated Fatty Acids Revert Diet Induced HypothalamicInflammation in Obesity, **PLoS ONE**, Vol.7(1), 2012.

CLIFFORD, D. B.; OLNEY, J. W.; MATIONIS, A.; COLLINS, R. C.; ZORUMSKI, C. F. The functional anatomy and pathology of lithium-pilocarpine and high-dose pilocarpine seizures. **Neuroscience**, v. 23, n.3, p. 953-968, 1987.

COCKERELL, O. C.; SHORVON, S. D. Epilepsia: Conceitos Atuais, São Paulo: Lemos editorial, 1997.

COSTA, J. C.; PALMINI, A.; YACUBIAN, E. M. T.; CAVALHEIRO, E. A. Ed, **Fundamentos neurobiológicos das epilepsias**. São Paulo: Lemos Editorial, 1998

CUKIERT, A. Epilepsias generalizadas. Ed. Segmento Farma, 2006

DIOP, A. G.; BOER, H. M.; MANDLHATE, C.; PRILIPKO L.; MEINARDI, H. The global campaign against epilepsy in Africa. **ActaTropica**, v. 87, p. 149-159, 2003.

DI PAOLO, G.; KIM, T.W. Linking lipids to Alzheimer's disease: cholesterol and beyond. **Nat. Rev. Neurosci.**, v.12, p.284–296, 2011.

DOLGANIUC, A. Role of lipid rafts in liver health and disease. **World Journal of Gastroenterology**, v.17(20), pp.2520-2535, 2011.

ENGEL, Jr. J. A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy. **Epilepsia**, v. 42, p. 796-903, 2001.

ENGEL, J. Jr. ILAE classification of epilepsy syndromes. **Epilepsy Research** 70 Suppl 1:S5-10, 2006.

ENGELHARDT, E. John Hughlings Jackson: um neurologista ingles. **Rev Bras Neurol.**, v.50(4), p.91-4, 2014.

FALINSKA, A. M. et al. The role of n-3 dietary polyunsaturated fatty acids in brain function and ameliorating Alzheimer's disease: Opportunities for biotechnology in the development of nutraceuticals. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 1, n. 2, p. 159–166, 2012.

FEOLI, A.M., ROEHRIG, C., ROTTA, L. N., KRUGER, A. H., SOUZA, K. B., KESSLER, A. M., et al. Serum and liver lipids in rats and chicks fed with diets containing different oils. **Nutrition**, n. 19, v.9. p. 789-93, 2003.

FERNSTROM, J. D. Effects of dietary polyunsaturated fatty acids on neuronal function. **Lipids**. v.34, n.2, p.161-9, 1999.

FERRARI D, CYSNEIROS RM, SCORZA CA, et al. Neuroprotective activity of omega-3 fatty acids against epilepsy-induced hippocampal damage: quantification with immunohistochemical for calcium-binding proteins. **Epilepsy Behav**. v.13, p.36–42, 2008.

FISHER, R. S., VAN EMDE BOAS, W., BLUME, W., ELGER, C., GENTON, P., LEE, P. et al. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). **Epilepsia**. v. 46(4), p. 470-2, 2005.

FONTANI G.; CORRADESCI F.; FELICI A.; ALFATTI F.; MIGLIORINI S. AND LODI L. Cognitive and physiological effects of Omega-3 polyunsaturated fatty

acid supplementation in healthy subjects. **European Journal of Clinical Investigation**, 2005.

FRANKEL, E. N. **Lipid Oxidation**. 2th. ed. [s.l.] Elsevier, p. 488, 2014.

FREEMAN, J. M.; KOSSOFF E. H.; FREEMAN, J. B.; KELLY, M. T. The ketogenic diet a treatment for children and others with epilepsy 4^a ed. Demos, 2007.

GORITZ, C.; MAUCH, D. H.; NAGLER, K.; PFRIEGER F. W. Role of glia-derived cholesterol in synaptogenesis: new revelations in the synapse–glia affair. **Journal of Physiology**, Paris, v.96, p.257–263, 2002.

GUERREIRO, C. A. M.; GUERREIRO, M. M.; CENDES, F.; LOPES-CENDES. Epilepsia, 1^a Ed, São Paulo: Lemos Editorial, 2000.

GUESNET, P.; ALESSANDRI, J.-M. Docosahexaenoic acid (DHA) and the developing central nervous system (CNS) - Implications for dietary recommendations. **Biochimie**, v. 93, n. 1, p. 7–12, 2011.

GUYTON, ARTHUR C. **Tratado de Fisiologia Médica**. 10^a ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2002.

HARBEBY, E. et al. N-3 fatty acids, neuronal activity and energy metabolism in the brain. **Oléagineux, Corps gras, Lipides (OCL)**, v. 19, n. 4, p. 238–244, 2012.

HEATHER, F.; RICHARD, S. The longer-term impacts of Western diet on human cognition and the brain, **Appetite**, v.63, p.119-28, 2013.

HERING, H.; LIN, C. C.; SHENG, M. Lipid rafts in the maintenance of synapses, dendritic spines, and surface AMPA receptor stability. **Journal of Neuroscience**, v.23, p.3262–3271, 2003.

HIRRLINGER, J.; NAVE, K.-A. Adapting brain metabolism to myelination and long-range signal transduction. **Glia**, 2014.

HORROCKS, L. A; FAROOQUI, A. A. Docosahexaenoic acid in the diet: its importance in maintenance and restoration of neural membrane function.

Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids, v. 70, n. 4, p. 361–72, 2004.

KOSSOFF, E. H. More fat and fewer seizures: dietary therapies for epilepsy. **The Lancet Neurology**, v.2, p.415-20, 2004.

KOUDINOV, A. R.; BEREZOV, T. T.; KOUDINOVA, N. V. The levels of soluble amyloid beta in different HDL subfractions distinguish Alzheimer's and normal aging CSF: implication for brain cholesterol pathology? **Neuroscience Letters**, v.314, p.115-18, 2001.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 4ed. Nova Iorque: W. H. Freeman, 2004.

LEITE, J. P.; BORTOLOTO, Z. A.; CAVALHEIRO, E. A. Spontaneous recurrent seizures in rats: An experimental model of partial epilepsy. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v.14, n.4, p.511-517, 1990.

LENT, R. **Cem bilhões de neurônios: conceitos fundamentais de neurociências**. São Paulo: Ed. Atheneu, 2004.

LI, G. L.; XIAO, B.; XIE, G. J. Temporal lobe epilepsy model induced by pilocarpine in rats. **Bulletin of Hunan Medical University**, v.28, n.1. p.29-32, 2003.

LOPES, C. D. **Análise de sinais de EEG utilizando a transformada wavelet discreta e as redes neurais artificiais**. 2005. Dissertação (Mestrado em engenharia elétrica), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2005.

LOPES, F. H. S. **Eletroencephalography: basic principles, clinical applications as related fields**. Baltimore: Urban & Schwarzenberg, p.871-897, 1987.

MACHADO, B. S. **Determinismo e Estocasticidade em Séries Temporais Empíricas**. Dissertação. Instituto de Física Teórica, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2003.

MARTÍN, M. G.; PFRIEGER, F.; DOTTI, C. G. Cholesterol in brain disease: sometimes determinant and frequently implicated. **EMBO reports**, v. 15, n. 10, p. 1036–52, 1 out. 2014.

MASSONE, F. **Anestesiologia Veterinária Farmacologia e Técnicas**. 6a. ed. [s.l.] Guanabara Koogan, 2011. p. 448

MATHERN, G. W.; BABB, T. L.; LEITE, J. P.; PRETORIUS, J. K., YEOMAN, K. M.; KUHLMAN, P. A. The pathogenic and progressive features of chronic human hippocampal epilepsy. **Epilepsy Research**, v.26, p.151-161, 1996.

MELLO, L. E.; CAVALHEIRO, E. A.; TAN, A. M.; KUPFER, W. R.; PRETORIUS, J. K.; BABB, T. L.; FINCH, D. M. Circuit mechanisms of seizures in the pilocarpine model of chronic epilepsy: cell loss and mossy fiber sprouting. **Epilepsia**, v.34, n.6, p.985-995, 1993.

MOREIRA, S. R. G. Epilepsia: concepção histórica, aspectos conceituais, diagnóstico e tratamento. **Mental**, v.2 n.3, 2004.

MURADORI, P.; DEFFUNEII, E. Rev. Bras. Hematol. Hemoter. v.29 n.2 São José do Rio Preto, 2007.

NIEDERMEYER, E. The normal EEG of the waking adult, in Electroencephalography : basic principles, clinical applications, and related fields. Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins, p.167-192, 2005.

NORDLI JR D. R., De V. The ketogenic diet revisited: back to the future. **Epilepsia**, v.38, p.743-9, 1997.

NORDLI, D. The ketogenic diet: uses and abuses. **Neurology**. 58.(suppl7): S21-S24, 2002.

NUZUKA-NAKAHARADA, L. M. Dieta Cetogênica e Dieta de Atkins Modificada no Tratamento da Epilepsia Refratária em Crianças e Adultos. **Journal of epilepsy and clinical neurophysiology**, v.14, n.2, p.65-69, 2008.

OLIVEIRA, S. N.; ROSADO, P. Electroencefalograma interictal: Sensibilidade e Especificidade no Diagnóstico de Epilepsia, Acta medica portuguesa, v.17, p.465- 470, 2004.

OUELLET, M. et al. Diffusion of docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids through the blood–brain barrier : An in situ cerebral perfusion study. **Neurochemistry International**, v. 55, p. 476–482, 2009.

PANCHAL, M., LOEPER, J., COSSEC, J.C., PERRUCHINI, C., LAZAR, A., POMPON, D.; DUYCKAERTS, C, Enrichment of cholesterol in microdissected Alzheimer's disease senile plaques as assessed by mass spectrometry. **J. Lipid Res.**, v.51, p.598–605, 2010.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, 7th Edition**. Academic Press, 2013

PESSOA, D. T.; CRUZ, R; MACHADO, B.; TENORIO, B.; NOGUEIRA, R. Analysis of electrocorticographic patterns in rats fed standard or hyperlipidic diets in a normal state or during status epilepticus. **Nutritional Neuroscience** 2015. DOI<http://dx.doi.org/10.1179/1476830515Y.0000000033>.

PERSINGER, M. A.; MAKAREC, K.; BRADLEY, J. C. Characteristics of limbic seizures evoked by peripheral injections of lithium and pilocarpine. **Physiology & Behavior**, v.44, n.1, p.27-37, 1988.

PRIEL, M. R.; SANTOS, N. F.; CAVALHEIRO, E. A. Developmental aspects of the pilocarpine model of epilepsy. **Epilepsy Research**, v.26, p.115-121, 1996. model induced by pilocarpine in rats. *Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao*, v.28, n.1. p.29-32, 2003.

REYNOLDS, E. H. Foreword. In: The treatment of epilepsy. Shorvon SD et al. (Eds.). London: Blacwell Science, 1996.

RIZZUTTI, S., RAMOS, A. M., MUSZKAT, M., GABBAI, A. A. Is hospitalization really necessary during the introduction of the ketogenic diet? **Journal of Child Neurology**, v.22, p.33-7, 2007.

SANTOS, W. Análise estatística do eletrocorticograma durante o fenômeno da depressão alastrante em córtex cerebral de ratos nutridos e desnutridos. Dissertação (Mestrado em Biometria e Estatística Aplicada) Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, 2007.

SEVIN, M., LESCA, G., BAUMANN, N., MILLAT, G., LYON-CAEN, O., VANIER, M.T. ;SEDEL, F. The adult form of Niemann-Pick disease type C. **Brain**, v.130, p.120–133, 2007.

SILVA, A.V; CABRAL, F. R. Ictogênese, Epileptogênese e Mecanismo de Ação das Drogas na Profilaxia e Tratamento da Epilepsia. **Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology**, v.14, p.39-45, 2008.

SILVA, G. E. G.; COSTA, N. T. T. O EEG nas epilepsias. **Jornal da Liga Brasileira de Epilepsia**, v.1, n.3, p.6-9, 1998.

SVERDLOFF, H. R. Obesidade: uma epidemia do século XXI. IMIP (Série Publicações Científicas do Instituto Materno Infantil Pernambuco), Recife, n. 31, jun. 2002. Disponível em: <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/>

TURSKI, L.; IKONOMIDOU, C.; TURSKI, W. A.; BORTOLLOTO, Z. A.; CAVALHEIRO, E. A. Review: cholinergic mechanisms and epileptogenesis. The seizures induced by pilocarpine: a novel experimental model of intractable epilepsy. **Synapse**, v.3, n.2, p.154-171, 1989.

WEISSTEIN, E. W. Fourier Transform. MathWorld, **A Wolfram Web Resource**. 2004.

ZHANG, J. e LIU, Q. REVIEW - Cholesterol metabolism and homeostasis the brain, **Protein Cell**. 2015 Apr; 6(4): 254–264, 2015.

Capítulo II

Efeito da suplementação com ômega-3 na atividade elétrica cerebral basal e durante o *status epilepticus* em rato

Artigo redigido de acordo com as normas da revista Epilepsy & Behavior.

Efeito da suplementação com ômega-3 na atividade elétrica cerebral basal e durante o *status epilepticus* em ratos

PESSOA, D.T.¹, SILVA, E.L.A.², NOGUEIRA, R.A.³

1,2,3 Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Laboratório de Biofísica Teórico-Experimental e Computacional – UFRPE Dois Irmãos, 52171-900, Recife, Pernambuco, Brasil.

Resumo

A dieta ocidental é rica em gordura saturada com baixo consumo de ômega-3. Os animais não são capazes de produzir ômega-3 a partir de seus próprios lipídios, sendo necessário que esse lipídio seja adquirido na dieta. Apesar de não serem sintetizados pelos animais, os ômega-3 são importantes componentes das membranas plasmáticas e variações em sua proporção podem causar alterações físico-químicas nestas, o que pode acarretar em alterações na fisiologia cerebral, com consequência na excitabilidade neuronal. Essas alterações ocorrem tanto em animais saudáveis como em portadores de epilepsia, que são mais sensíveis a alterações na atividade elétrica cerebral. Esse trabalho avaliou o efeito da suplementação com ômega-3 na atividade elétrica cerebral basal antes e durante o *status epilepticus* em ratos. Para avaliar essa atividade elétrica do cérebro foram registrados eletrocorticogramas (ECoG's) de animais suplementados e não suplementados com ômega-3 antes e durante o *status epilepticus* induzido pela pilocarpina. O cálculo da potência média das ondas cerebrais no espectro de potência revelou que o ômega-3 elevou a excitabilidade cerebral em relação ao controle, avaliado através da redução da potência média em 20% para onda delta e um aumento de 45% para onda beta. Esses efeitos foram exacerbados quando os animais além de suplementados com ômega-3 foram submetidos ao *status epilepticus*. Neste caso, a potência média da onda delta foi reduzida em 36,9% e da onda beta aumentada em 51,7%, ambas em relação ao controle. Embora os animais suplementados com ômega-3 apresentassem uma maior excitabilidade em sua atividade elétrica cerebral basal, durante o *status epilepticus*, os dois grupos apresentaram uma hiperexcitabilidade característica do *status epilepticus*, sem diferenças significativas entre os grupos. Mesmo o *status epilepticus* apresentando nível de excitabilidade cerebral semelhante entre os dois grupos,

os danos celulares sofridos pelos animais suplementados com ômega-3 foram muito mais tênues, revelando o efeito neuroprotetor do ômega3.

Palavras-chave: ômega-3; ECoG; atividade elétrica cerebral; epilepsia; espectro de potência

1. Introdução

Os ácidos graxos consumidos na dieta apresentam dois caminhos principais: a formação de triglicerídeos e a incorporação nos fosfolipídios da membrana plasmática. Os fosfolipídios, em geral, apresentam uma cabeça polar ligada a duas cadeias de ácido graxo. A ligação com os diferentes tipos de ácidos graxos geram uma grande variedade de fosfolipídios. Quanto mais saturada for a cadeia de ácido graxo nos fosfolipídios, menos fluida será a membrana e quanto maior a insaturação desses lipídios, maior a fluidez da membrana. Dessa forma, o equilíbrio entre ácidos graxos saturados e insaturados é importante para a manutenção da fluidez ótima da membrana (Nelson e Cox, 2004¹; Ouellet et al., 2009²).

A presença dos ácidos graxos insaturados das famílias ômega-3 e ômega-6 na dieta são especialmente importantes para os seres humanos, devido ao fato de não possuírem as enzimas Delta-12 e Delta15-desaturases. Essas enzimas são responsáveis pela inserção de duplas ligações nos carbonos que antecedem o carbono 9 a partir do grupo metil, desta forma, os seres humanos são incapazes de produzir ácidos graxos das famílias ômega-3 e ômega-6 a partir de um ácido graxo produzido no organismo (Gurr, et al., 2002³), por este motivo, os ácidos graxos dessas famílias são denominados ácidos graxos essenciais. Além disso, a dieta ocidental ainda é pobre em ácidos graxos poli-insaturado do tipo ômega-3 e rica em ácidos graxos saturados, daí advém a importância da inserção desses lipídios na dieta.

Além disso, é importante manter a proporção adequada entre os ácidos graxos ômega-6 e ômega-3 na dieta, pois estes competem pelo mesmo complexo enzimático, sendo que o primeiro dá origem a respostas a eicosanoides pró-inflamatórios, enquanto o segundo dá origem a eicosanoides com respostas anti-inflamatória, em especial os ácidos graxos poli-insaturados (AGPIs) ômega-3 EPA e DHA (Falinska, et al., 2012⁴; Gunstone, et al., 2007⁵; Schmitz e Ecker, 2008⁶; Tapiero et al., 2002⁷). Motivados por esses achados, pesquisas têm sido realizadas visando investigar o efeito neuroprotetor do ômega-3 (Hong et al., 2003⁸).

Estudos vêm mostrando que os ácidos graxos poli-insaturados (AGPIs) da dieta são preferencialmente incorporados pelos fosfolipídios em comparação com sua associação a triglicerídeos (Balogun, et al., 2013⁹). O DHA e o EPA passam com facilidade pela barreira hematoencefálica e podem ser incorporados aos fosfolipídios da membrana dos neurônios (Ouellet et al., 2009²). Como dito anteriormente, a incorporação desses AGPIs tendem a aumentar a fluidez da membrana dos neurônios e dos oligodendrócitos, que formam a bainha de mielina dos neurônios (Horrocks; Farooqui, 2004¹⁰). Desta forma, é razoável propor que aumento da fluidez das células do sistema nervoso, pode facilitar a geração e propagação de potenciais de ação, o que aumentaria a atividade elétrica cerebral.

Fatores que alterem a atividade elétrica cerebral devem ter seus efeitos investigado em pacientes epiléticos, uma vez que esta é uma das doenças neurológicas mais comuns e está diretamente ligada a hiperexcitabilidade cerebral patológica. Enquanto estudos indicam que a suplementação de ômega-3 diminui a duração e frequência de crises (Schlanger, et al. 2002¹¹), outros indicam que essa suplementação não causou nenhum efeito antiepilético (Bromfield, et al., 2008¹²). Diante do exposto, esse trabalho visa investigar a influência da suplementação com ômega-3 na atividade elétrica cerebral basal em indivíduos saudáveis e durante o *status epilepticus*.

2. Materiais e métodos

Foram utilizados 38 ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*, var. *albinus*) provenientes do biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Os animais foram mantidos em ambiente adequado com temperatura ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) e umidade (50%) controlada, em ciclo claro-escuro de 12 horas, com água e alimentação *ad libitum*. Os procedimentos foram realizados de acordo com as normas do Comitê de Ética no Uso de Animais (licença nº 103/2014 – CEUA/UFRPE).

2.1. Desenho experimental

Os animais foram divididos em dois grupos: Grupo 1 (n=20), animais que se alimentaram apenas da dieta padrão de laboratório, ração comercial Presence® 7883. Grupo 2 (n=18), animais que se alimentaram com a ração padrão de laboratório e foram suplementados com óleo de peixe contendo 180 mg de EPA e 120 mg de DHA por grama, em uma dose de 1g/dia administrada via gavagem. A suplementação foi feita dos 60 aos 120 dias. Ao atingirem os 120 dias de idade, 10 animais de cada grupo foram destinados para análise histológica e os demais foram destinados ao registro da atividade elétrica cerebral.

2.2. Provas laboratoriais

Os níveis sanguíneos de triglicerídeos e colesterol total foram obtidos através das amostras de sangue (0,5 mL) dos animais. As amostras sanguíneas foram coletadas por meio de punção da veia caudal lateral com o auxílio de um cateter venoso Nº 24 em tubos com anticoagulante. A análise foi realizada utilizando-se o equipamento Accutrend® Plus (Roche) imediatamente após a coleta.

2.3. Análise histológica

Para a análise histológica os animais foram divididos em 4 grupos: Grupo 1: animais normonutridos. Grupo 2: animais normonutridos e submetidos ao *status epilepticus* por um período de 4 horas. Grupo 3: animais suplementados com ômega-3. Grupo 4: animais alimentados com ômega-3 e submetidos ao *status epilepticus* por um período de três horas.

Após o aprofundamento anestésico todos os animais foram perfundidos com solução fisiológica (NaCl 0,9%) e posteriormente, com formaldeído 10% em tampão fosfato (pH 7,4). Os cérebros dos animais foram coletados e fixados em solução tamponada de formaldeído 10%. Fragmentos de orientação coronal de cérebro foram desidratados em concentrações crescentes de álcool

etílico (70% ao P.A.), diafanizados em xilol, impregnados e incluídos em Paraplast Plus®.

As Secções do hipocampo foram obtidas utilizando-se um micrótomo rotativo Leica®, com cortes de 4 micrometros, seriados, em um plano coronal, na altura do III ventrículo, equivalente a seccão 21 (Bregma: -1.70 mm e nível 74). Após esse procedimento os cortes foram corados pela técnica da Hematoxilina-Eosina (H.E.), segundo metodologia descrita por Behmer, Tolosa e Freitas Neto (1976)¹³, e com coloração de Cresil Violeta (coloração de Nissl). Fotomicrografias foram obtidas em microscópio de luz Leica® em aumentos de 40X e 400X, com auxílio do software ImageJ® para avaliação histopatológica da região CA1, CA2, CA3, giro denteado e hilo do giro denteado da formação hipocampal.

2.4. Procedimento cirúrgico para implante de eletrodo

Aos 115 dias de idade, os animais foram anestesiados com uma associação de cetamina (50 mg) e xilazina (20 mg), na dose de 0,1 mL/100 g de peso corporal, administrada por via intramuscular. A temperatura corporal foi mantida em torno de $37,5 \pm 1^{\circ}\text{C}$ com o auxílio de um aquecedor elétrico posicionado sob o animal. Após a tricotomia e anti-sepsia do campo cirúrgico a cabeça do animal foi fixada a base de um aparelho estereotáxico (Insight®). Após a fixação da cabeça do rato, foi realizada uma incisão longitudinal da pele na linha média do crânio. Posteriormente, com um auxílio de uma broca odontológica, foram realizados dois orifícios nos quais foram posicionados dois parafuso cirúrgicos sobre o hemisfério esquerdo. Um parafuso foi posicionado na região parietal no córtex sensório-motor, cerca de 1,5 a 2,5 mm anterior e 1 a 2 mm lateral ao bregma, e outro parafuso de mesmo tipo, foi colocado sobre o osso frontal (eletrodo de referência). Os parafusos tiveram sua fixação reforçada com resina acrílica, após a completa secagem da resina a pele foi suturada, expondo apenas os parafusos que serviram de eletrodo.

2.5. Registro da atividade elétrica cerebral basal e durante o status epilepticus

Após um período de sete dias, no qual se verificava a completa cicatrização da cirurgia, cada animal teve sua atividade elétrica cerebral registrada por 1 hora com um aparelho EMG 410C (EMG System, Brasil) numa taxa de amostragem de 6000 S/s. Durante o registro do ECoG, os animais foram alocados em uma gaiola de Faraday (Pessoa, 2015¹⁴). Para cada animal o ECoG basal foi obtido por 30 minutos (linha de base), após esse intervalo, foi administrada pilocarpina intraperitonealmente em uma dose de 350mg/Kg de peso e o registro prosseguiu por mais 30 minutos (*status epilepticus*). Finalizados os registros, os animais foram eutanasiados por meio de aprofundamento anestésico.

2.6. Análise dos registros de ECoG

Os registros do ECoG foram segmentados em janelas de 2 minutos. Esses segmentos foram importados para o programa Matlab, no qual foi implementado o algoritmo do espectro de potência das ondas cerebrais do ECoG.

2.7. Transformada de Fourier e espectro de potência

A Transformada de Fourier (TF) torna possível o conhecimento da contribuição de cada componente de frequência presente numa serie temporal. A TF é calculada a partir da decomposição do sinal complexo oscilatório em suas frequências componentes. A função $F(f)$ é a transformada direta de Fourier da função temporal $F(t)$, que representa as amplitudes das várias frequências de ondas que constituem o sinal $F(t)$; passando uma informação no tempo para o domínio da frequência. Então, $F(f)$ representa o grau de participação das componentes frequenciais da função $F(t)$, conforme se pode observar na equação a seguir (Weisstein, 2004¹⁵)

$$F(f) = \int_{-\infty}^{\infty} f(t)e^{-i2\pi ft} dt$$

O quadrado da Transformada de Fourier do ECoG gera seu espectro de potência. A potência média obtida no espectro permite estimar a contribuição dos diferentes ritmos cerebrais no sinal ECoG. Formalmente, a energia no espectro de potência para um sinal eletrofisiológico específico pode ser calculado como segue:

$$\overline{E}_{\omega} = \frac{\int_{f_s}^{f_e} |F(f)|^2 df}{\int_{f_s}^{f_e} df}$$

Onde $F(f)$ é a Transformada de Fourier é do sinal $f(t)$, aqui representado pelo ECoG. $\overline{E}_{\omega}$ é a energia do espectro de potência normalizado por um determinado intervalo de frequência $\omega = [f_s, f_e]$, aqui representado pelos diferentes ritmos (Machado et al., 2012).

2.8. Análise estatística

O delineamento estatístico foi realizado utilizando testes não-paramétricos. O teste de Wilcoxon foi utilizado para dados dependentes (pareados) e o teste de Mann-Whitney foi utilizado para as amostras independentes (não pareadas). Os resultados foram expressos através de média $\pm$ desvio padrão. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3. Resultados

Níveis de lipídios plasmáticos

Os animais suplementados com ômega-3 apresentaram ganho de peso significativamente menor que os animais controle ($p=0,001$). Essa

suplementação também foi capaz de reduzir os níveis séricos de triglicerídeos ($p=0,01$). Já os níveis de colesterol total não apresentaram diferença entre os grupos (Tabela 1).

Tabela 1. Ganho de peso (g), níveis séricos de triglicerídeos e colesterol (mg/dl) em ratos controle e suplementados com ômega-3 por 60 dias.

	Peso		Triglicerídeo	Colesterol
	60 dias	120 dias	120 dias	120 dias
Controle	292,00± 25,12	366,2± 3,82 ^a	123,67± 12,4 ^a	152,40± 13,55
Ômega-3	287,00± 45,58	329 ± 41,93 ^b	104,00± 10,43 ^b	152,00± 4,60

Média ± desvio padrão. Diferentes letras na mesma linha (coluna) representam diferença estatística significativa.

3.1. Análise histopatológica do tecido cerebral

A análise histológica da formação hipocampal revelou que nos animais não suplementados com ômega-3 (controle) o *status epilepticus* provocou morte celular massiva, com desestruturação das camadas celulares, principalmente nas regiões CA1, CA3 e giro denteado. Foi também encontrado: morte neuronal, células de *gitter*, responsáveis por fagocitar neurônios e intensa vacuolização (Figura 2). Porém nos animais suplementados com ômega-3 não foi identificada morte neuronal aparente, revelando o efeito protetor do ômega-3 (Figura 1).

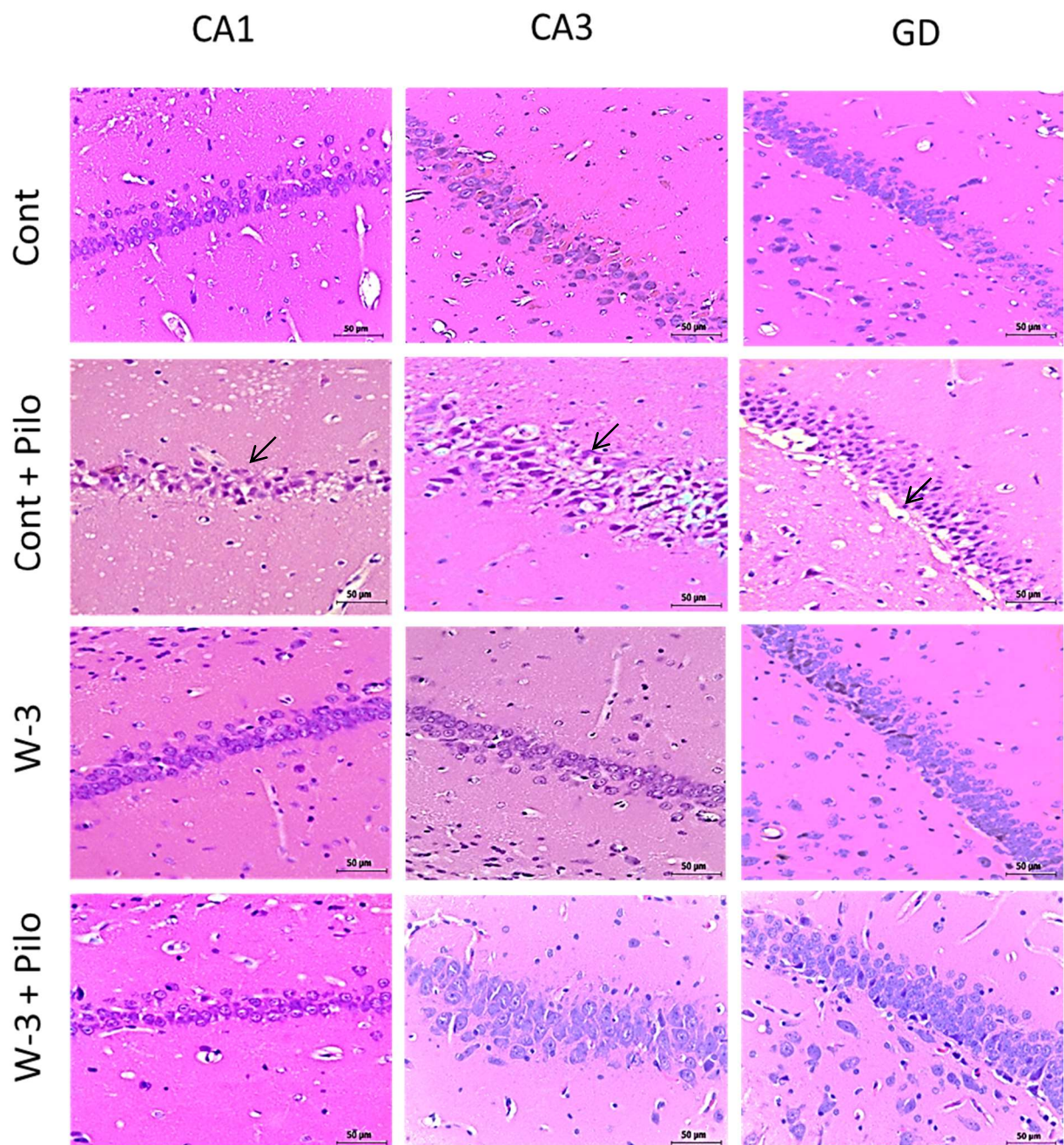


Figura 1. Fotomicrografias das regiões CA1, CA3 e Giro denteado (GD) do hipocampo de rato em secção coronal, de animais: controle (Cont); controle submetido ao *status epilepticus* (Cont + Pilo); suplementados com ômega-3 (w-3); e suplementados com ômega-3 e submetidos ao *status epilepticus* (w-3 + Pilo). Setas indicam vacuolização por morte neuronal (Coloração: Hematoxilina e Eosina).

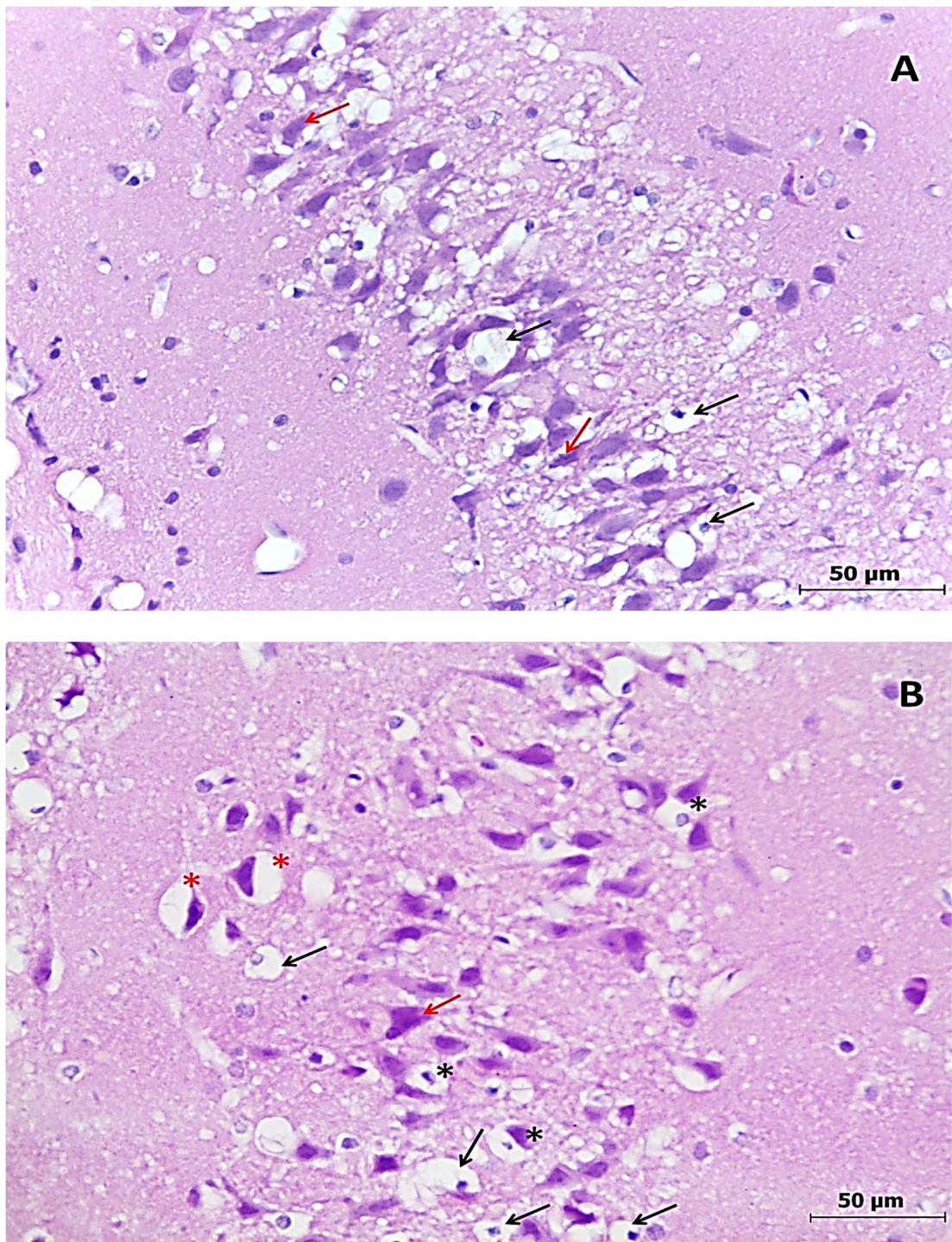


Figura 2. Fotomicrografias de secção coronal do hipocampo de animal controle tratado com pilocarpina evidenciando lesões decorrentes do *status epilepticus*. Marcações indicam células de *gitter* (setas pretas), morte neuronal (setas vermelhas), neuroniofagia (asterisco preto) e vacuolização por morte neuronal (asterisco vermelho). A figura 2.A corresponde a região do hilo e a figura 2.B corresponde a região CA4 do hipocampo (Coloração: Hematoxilina e Eosina).

3.2. Atividade elétrica cerebral em resposta a suplementação com ômega-3

A suplementação com ômega-3 tornou a atividade elétrica cerebral mais rápida demonstrada pelo espectro de potência. A potência média das principais ondas cerebrais revelou que os animais que receberam o ômega-3 apresentaram um aumento de 45% na energia da onda beta ($p=0,0004$) em relação ao controle, enquanto para onda delta a energia foi reduzida em 20% em relação ao controle ($p=0,02$) (Tabela 2) (Figura 3). Portanto, a elevação da energia da onda beta, que é uma onda cerebral mais rápida, e a redução da energia da onda delta, que é uma onda mais lenta, torna a atividade elétrica cortical mais rápida. As ondas teta e alfa não foram significativamente alteradas.

Tabela 2. Valores de potência média ($\mu\text{V}^2\cdot\text{Hz}^{-1}$) das diferentes ondas cerebrais nos animais controle e suplementados com ômega-3, antes e durante o *status epilepticus*.

Grupo	Delta		Teta		Alfa		Beta	
	Basal	SE	Basal	SE	Basal	SE	Basal	SE
Controle	13,60±	10,96±	6,49±	7,32±	2,46±	2,59±	0,85±	1,21±
	2,28 ^a	3,24	1,75	2,02	0,70	0,77	0,16 ^a	0,31
Omega-3	11,01±	8,59 ±	6,61 ±	9,33 ±	2,70 ±	2,41 ±	1,24 ±	1,29±
	1,28 ^b	0,94	0,92	2,56	0,46	0,51	0,18 ^b	0,28

Média ± desvio padrão. Diferentes letras na mesma coluna para a mesma onda representam diferença estatística significativa.

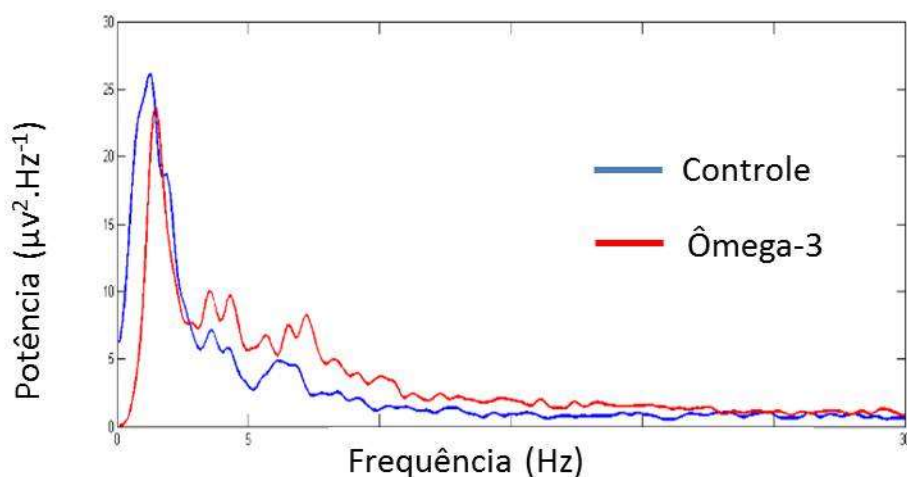


Figura 3. Espectro de potência da linha de base dos animais controle e alimentados com ômega-3

3.3. Atividade elétrica cerebral em resposta ao status epilepticus

Após a aplicação da pilocarpina é possível observar no registro uma diminuição na amplitude das ondas e um aumento na frequência. A esse período se segue o aparecimento periódico de ondas repetitivas de maior amplitude (Figura 4). Os valores das potências médias indicadas nesse trabalho para o *status epilepticus* é uma média de todos os valores no decorrer dos 30 minutos de registro.

Nos animais normonutridos durante o *status epilepticus* o espectro de potência indicou um aumento significativo da onda beta ($p < 0,001$), em relação a sua linha de base. O que indica o aumento da excitabilidade durante o *status epilepticus*.

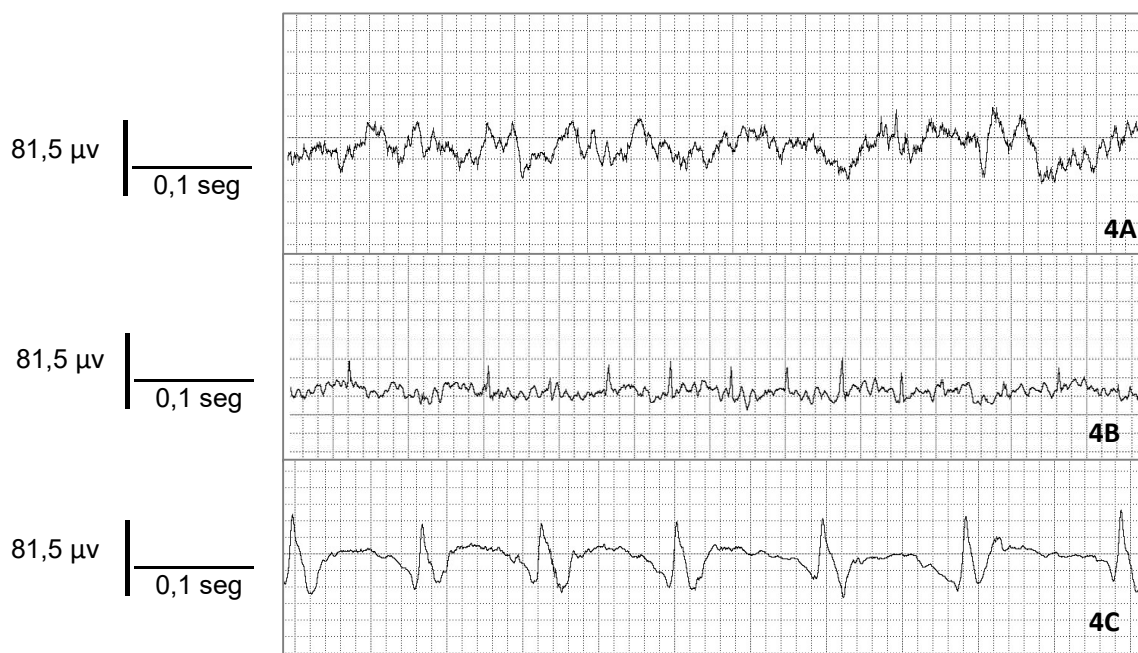


Figura 4. Registro de ECoG de animais antes do SE (linha de base) (4A) e durante o SE (4B e 4C). 4B mostra a primeira manifestação do SE e 4C ondas epileptiformes que intercalam momentos como os mostrados em 4B no decorrer do registro.

s animais suplementados com ômega-3 ao serem submetidos ao *status epilepticus* apresentaram diminuição da potência média da onda delta ($p=0,01$) e aumento da onda teta ($p=0,01$) em relação a sua linha de base. Os valores da potência média para onda beta se mantiveram elevados (Tab.2). Durante o *status epilepticus*, não houve diferenças significativas entre os grupos, com ambos mostrando o aumento da excitabilidade cerebral (Figura 5).

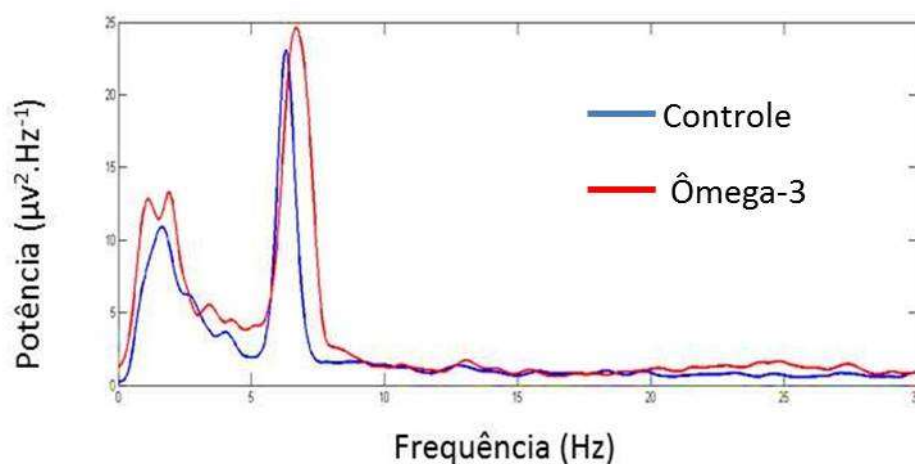


Figura 5. Espectro de potência de animais controle e suplementados com ômega-3 durante o *status epilepticus*.

4. Discussão

4.1. Peso corporal e níveis séricos de colesterol e triglicerídeos

A suplementação com ômega-3 reduziu os níveis sanguíneos de triglicerídeos. Esse resultado já é conhecido na literatura, que vem mostrando o efeito dos AGPIs na diminuição dos níveis de triglicerídeos (Adkins e Kelley, 2010¹⁶). Essa diminuição vem sendo relacionada ao decréscimo na produção hepática e secreção de lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL), moléculas carreadoras de triglicerídeos (TG), e por aumento da depuração de VLDL-TG de circulação (Shearer, et al., 2012¹⁷). A diminuição dos níveis de TG pode ser a responsável pelo menor peso corporal dos animais suplementados

com ômega-3, uma vez que com a menor taxa de TG no plasma, menor será incorporação desse lipídio no tecido adiposo.

4.2. Histologia do tecido cerebral

A morte neuronal na região hipocampal, principalmente na região CA1, CA2 e CA3, causada pelo *status pilepticus* induzido pela pilocarpina relatada nesse trabalho já é bem descrito na literatura (Ferrari, et al., 2008²⁵). Porém, as lesões causadas pelo *status epilepticus* foram muito discretas nos animais suplementados com ômega-3, revelando um efeito neuroprotetor. Esse resultado corrobora os encontrados por Cysneiros e colaboradores, 2010¹⁸, que também relatam o efeito neuroprotetor do ômega-3.

A pilocarpina é um agonista colinérgico mucarínico. A ideia aceita, com base em estudos experimentais, é que a ativação do sistema colinérgico ative os neurônios excitatórios glutamatérgicos, dando início ao *status epilepticus*. A liberação sináptica excessiva de glutamato apresenta efeito excitotóxico, mantendo a célula despolarizada, o que aumenta o influxo de cálcio no neurônio levando a morte celular (Choi et al., 1987¹⁹). Dessa forma, o *status epilepticus* e morte neuronal não se dá pelo efeito tóxico da pilocarpina, mas pelo efeito do excesso da liberação de glutamato que ela provoca, sendo este efeito excitotóxico. Esse mecanismo é apontado como causador do *status epilepticus* e consequente morte neuronal causadora da esclerose hipocampal em pacientes portadores de epilepsia.

Foi possível observar que os animais que foram suplementados com ômega-3 apresentaram manifestação do *status epilepticus* similares aos animais controle, tanto no desenvolvimento motor da crise, quanto nos registro de ECoG e distribuição das principais ondas cerebrais. Porém, a morte celular provocada pelo *status epilepticus* foi notavelmente mais discreta nos animais suplementados com ômega-3. Desta forma, pôde-se observar que o ômega-3 não impediu o desenvolvimento da crise, mas protegeu as células dos danos causados por ela. Com base em seu efeito neuroprotetor pode-se inferir que a suplementação com ômega-3 ao amenizar as lesões causadas pelo *status*

epilepticus, possa diminuir a probabilidade de ocorrência e a severidade de crises subsequentes em pacientes com epilepsia. Esse efeito pode ter ocorrido devido à ação anti-inflamatória do ômega-3 no cérebro, que vêm sendo relatada em alguns estudos (Bellissimo, et al., 2001²⁰; Gopez, et al., 2005²¹; Naffah-Mazzacoratti, et al., 1995²²).

4.3. Suplementação com ômega-3 e a atividade elétrica basal

O aumento da potência média da onda beta, mais rápida, e a diminuição da onda delta, mais lenta, no ECoG basal dos animais que receberam suplementação com ômega-3 indica que esse lipídio aumentou a excitabilidade cerebral. Esse aumento pode ter se dado devido ao aumento da fluidez da membrana. Níveis mais elevados de ácidos graxos insaturados nos fosfolipídios de membrana aumentam a fluidez da mesma, o que pode fornecer um ambiente adequado para os canais iônicos desempenharem suas funções, facilitando o trânsito iônico (Yehuda, 2003²³). Desta forma, a célula pode tornar-se mais excitável, aumentando assim, a velocidade de geração e propagação dos potenciais de ação. Esse efeito, pode ainda indicar, uma melhora nos processos cognitivos, o que seria benéfico para pessoas saudáveis ou que apresentem alguma doença que prejudique os processos cognitivos, como a Doença de Alzheimer (Falinska, et al., 2012⁴).

4.4. Suplementação com ômega-3 e o *status epilepticus*

O aumento nas ondas mais rápidas em detrimento das ondas mais lentas evidenciados no espectro de potência durante o *status epilepticus* indicam a hiperexcitabilidade cerebral característica das crises epiléticas (Priel, 1996²⁴; Pessoa, 2015¹⁴). Quando comparados à linha de base, os efeitos do *status epilepticus* foram mais pronunciados nos animais que receberam ômega-3 de que nos animais normonutridos. Esse efeito pode ser explicado pelo aumento da excitabilidade na atividade elétrica basal dos animais que foram suplementados com ômega-3.

O modelo da pilocarpina gera a morte neuronal nas regiões CA1, CA3 e no giro denteado do hipocampo. A morte de interneurônios gabaérgicos, neurônios inibitórios, no hipocampo vem sendo apontada como uma das principais causas da hiperexcitação sincrônica gerada pela pilocarpina (Ferrari, et al., 2008²⁵). Estudos demonstraram que a suplementação com ômega-3, resultou em grande preservação de células gabaérgicas hipocampais em animais submetidos a epilepsia, indicando um efeito neuroprotetor do ômega-3 (Cysneiros, et al., 2010¹⁸).

A suplementação com ômega-3 aumentou a excitabilidade cerebral, o que poderia favorecer o início de uma crise epilética, uma vez que, os portadores de epilepsia só desenvolvem crise quando a excitação neuronal ultrapassa o seu limiar crítico (Hauser e Josephson, 2015²⁶). Porém, durante o *status epilepticus* não foram encontradas diferenças significativas na distribuição das ondas cerebrais entre os dois grupos nutricionais. Esse achado sugere que embora os animais suplementados com ômega-3 apresentem uma maior atividade elétrica cerebral basal, isso não foi um agravante durante o *status epilepticus*.

Desta forma, esse trabalho evidencia que embora o ômega-3 aumente a excitabilidade cerebral basal e não impeça que o *status epilepticus* se estabeleça, esse lipídio apresenta um efeito neuroprotetor diminuindo as lesões neuronais provocadas pelo *status epilepticus* prolongado. Diante disto, é possível inferir que a suplementação com ômega-3 em pacientes com epilepsia ao diminuir os danos celulares a cada crise, pode diminuir a probabilidade de ocorrência e a severidade de crises subsequentes.

5. Conclusão

A suplementação com ômega-3 foi capaz de diminuir o ganho e peso e os níveis séricos de triglicerídeos. O ômega-3 também mostrou atividade no sistema nervoso, aumentando a excitabilidade cerebral. Todavia, durante o aumento da excitabilidade cerebral característico do *status epilepticus*, o espectro de potência não mostrou diferenças significativas na distribuição das

ondas cerebrais entre os grupos. Esse resultado indica que o ômega-3 não impediu a instalação do *status epilepticus*, nem diminuiu sua severidade, porém diminui as lesões deixadas pelo *status epilepticus*, revelando um efeito neuroprotetor.

Referências

1. Nelson DL, Cox MM. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 4ed. Nova Iorque: W. H. Freeman; 2004.
2. Ouellet M, Emond V, Chen CT, Julien C, Bourasset F, Oddo S, LaFerla F, Bazinet RP, Calon F. Diffusion of docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids through the blood–brain barrier: An in situ cerebral perfusion study. *Neurochem Int*. 2009; 55(7):476-82.
3. Gurr MI, Frayn KN, Harwood JL. *Lipid Biochemistry*, fifth ed. Blackwell Scientific, Oxford; 2002.
4. Falinska AM, Colombo CB, Guschina IA, Good M, Harwood JL. The role of n-3 dietary polyunsaturated fatty acids in brain function and ameliorating Alzheimer's disease: Opportunities for biotechnology in the development of nutraceuticals. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 2012; 1(2):159–66.
5. Gunstone FD, Harwood JL, Dijkstra AJ. (Eds.), *The Lipid Handbook*, third ed. Taylor and Francis, Boca Raton, FL; 2007.
6. Schmitz G, Ecker J. The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. *Prog Lipid Res*. 2008; 47:147–57.
7. Tapiero H, et al. Polyunsaturated fatty acids (PUFA) and eicosanoids in human health and pathologies. *Biomed Pharmacother* 2002; 56:215–22.
8. Hong S, Gronert K, Devchand PR, Moussignac RL, Serhan CN. (2003) Novel docosatrienes and 17S-resolvins generated from docosahexaenoic acid in murine brain, human blood, and glial cells autacoids in anti-inflammation. *J Biol Chem* 278:14677–14687.
9. Balogun KA, Albert CJ, Ford DA, Brown RJ, Cheema SK. Dietary Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids Alter the Fatty Acid Composition of Hepatic and Plasma Bioactive Lipids in C57BL/6 Mice: A Lipidomic Approach. *PloS one* 2013; 8(11):82399.
10. Horrocks LA, Farooqui AA. Docosahexaenoic acid in the diet: its importance in maintenance and restoration of neural membrane function. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2004; 70: 361-72.

11. Schlanger S, Shinitzky M, Yam D. Diet enriched with omega-3 fatty acids alleviates convulsion symptoms in epilepsy patients. *Epilepsia* 2002; 43:103–4.
12. Bromfield E, Dworetzky B, Hurwitz S, et al. A randomized trial o polyunsaturated fatty acids for refractory epilepsy. *Epilepsy Behav* 2008;12:187–90.
13. Behmer AO, Tolosa EMC, Freitas Neto AG. Manual de tecnicas para histologia e patologia. 1a ed. Sao Paulo, Edart; 1976.
14. Pessoa DT, Cruz R, Machado B, Tenorio B, Nogueira R. Analysis of electrocorticographic patterns in rats fed standard or hyperlipidic diets in a normal state or during *status epilepticus*. *Nutr Neurosci* 2015. DOI<http://dx.doi.org/10.1179/1476830515Y.0000000033>.
15. Weisstein EW. Fourier Transform. MathWorld, A Wolfram Web Resource. 2004.
16. Adkins Y, Kelley DS. Mechanisms underlying the cardioprotective effects of Omega-3 polyunsaturated fatty acids. *J Nutr Biochem* 2010; 21(9):781-92.
17. Shearer GC, Savinova OV, Harris WS. Fish oil – how does it reduce plasma triglycerides? *Biochim Biophys Acta* 2012; 1821(5):843–51.
18. Cysneiros RM, Ferrari D, Arida RM, Terra VC, De Almeida ACG, Cavalheiro EA, Scorza FA. Qualitative analysis of hippocampal plastic changes in rats with epilepsy supplemented with oral omega-3 fatty acids. *Epilepsy Behav* 2010; 17(1):33-8.
19. Choi DW, Mauluccigedde M, Kriegstein AR. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J of Neurosci* 1987; 79(2):357-68.
20. Bellissimo MI, Amado D, Abdalla DS, Ferreira EC, Cavalheiro EA, Naffah-Mazzacoratti MG. Superoxide dismutase, glutathione peroxidase activities and the hydroperoxide concentration are modified in the hippocampus of epileptic rats. *Epilepsy Res.* 2001; 46:121–8.

21. Gopez JJ, Yue H, Vasudevan R. et al. Cyclooxygenase-2-specific inhibitor improves functional outcomes, provides neuroprotection, and reduces inflammation in a rat model of traumatic brain injury. *Neurosurgery* 2005; 56:590–604.

22. Naffah-Mazzacoratti MG, Bellissimo MI, Cavalheiro EA. Profile of prostaglandin levels in the rat hippocampus in pilocarpine model of epilepsy. *Neurochem Int.* 1995; 27:461–6.

23. Yehuda S. Omega-6/omega-3 ratio and brain-related functions. *World Rev Nutr Diet* 2003; 92:37–56.

24. Priel MR, Santos NF, Cavalheiro EA. Developmental aspects of the pilocarpine model of epilepsy. *Epilepsy Res* 1996; 26(1):115-21.

25. Ferrari D, Cysneiros RM, Scorza CA, et al. Neuroprotective activity of omega-3 fatty acids against epilepsy-induced hippocampal damage: quantification with immunohistochemical for calcium-binding proteins. *Epilepsy Behav* 2008; 13:36–42.

26. Hauser SL, Josephson SA. *neurologia Clínica de Harrison*. 3ª ed. AMGH Editora, 2015.

Capítulo III

Efeito da dieta hipercolesterolêmica na atividade elétrica cerebral basal e durante o *status epilepticus* em ratos

Artigo redigido de acordo com as normas da revista *Epilepsy & Behavior*.

Efeito da dieta hipercolesterolêmica na atividade elétrica cerebral basal e durante o *status epilepticus* em ratos

PESSOA, D.T.¹, SILVA, E.L.A.², NOGUEIRA, R.A.³

1,2,3 Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Laboratório de Biofísica Teórico-Experimental e Computacional – UFRPE Dois Irmãos, 52171-900, Recife, 7 Pernambuco, Brasil.

Resumo

O colesterol é importante na homeostase cerebral, auxiliando na função isolante da bainha de mielina, no funcionamento adequado dos receptores neuronais e até na formação e transmissão sináptica. Desta forma, variações nos níveis cerebrais de colesterol podem alterar o funcionamento adequado do sistema nervoso e acarretar em alterações em sua atividade elétrica. Dietas hiperlipídicas ricas em colesterol e gorduras saturadas estão cada vez sendo mais consumidas, sendo o cérebro um órgão rico em lipídios, é razoável pensar que alterações na quantidade e na qualidade lipídica da dieta possam interferir na excitabilidade cerebral. Portadores de epilepsia apresentam-se mais sensíveis às alterações na excitabilidade cerebral, uma vez que apresentam uma tendência a hiperexcitabilidade espontânea. Diante disso, esse trabalho analisou alterações na atividade elétrica cerebral provocadas pela dieta hiperlipídica em ratos normais e durante o *status epilepticus*. Para esse fim, foram realizados eletrocorticogramas (ECoG) nos animais normonutrido e alimentados com dieta hiperlipídica antes e durante o *status epilepticus* induzido pela pilocarpina. O cálculo da potência média das ondas cerebrais no espectro de potência revelou que a dieta hiperlipídica causou o aumento da atividade elétrica cerebral, revelado pelo aumento da potência média da onda beta (14-30 Hz) e diminuição da potência média da onda delta (0,5-4 Hz). Esse aumento da atividade elétrica cerebral foi ainda maior quando os animais foram alimentados com a dieta hiperlipídica e submetidos ao *status epilepticus*.

Palavras-chave: colesterol, espectro de potência, epilepsia.

1. Introdução

O colesterol é um componente essencial das membranas celulares, sendo importante na manutenção das propriedades físico-químicas dessas membranas, tais como a fluidez e permeabilidade da membrana (Zhang e Liu, 2014¹). A bainha de mielina que envolve os neurônios é uma especialização da membrana plasmática de células gliais, que confere proporções elevadas de lipídios, dentre eles o colesterol, no sistema nervoso. Os elevados índices de lipídios na composição cerebral indicam a importância desses compostos para estrutura e função do sistema nervoso. O cérebro é composto 80% de lipídios, e detém cerca de 25% do colesterol de todo o corpo (Björkhem et al., 2004²), sendo este, principalmente concentrado na bainha de mielina onde desempenha papel de isolante elétrico (Dietschy e Turley, 2004³), apresentando desta forma, importância crucial na propagação adequada dos potenciais pós-sinápticos e de ação.

Além disso, o colesterol é particularmente concentrado em microrregiões denominadas *rafts* lipídicos, os quais servem de aporte para receptores membranares, tais como os canais iônicos nos neurônios. Estudos têm reforçado essa interação entre os *rafts* e os receptores membranares mostrando sua importância na regulação da função desses receptores (Burger, 2000⁴; Pucadyil e Chattopadhyay, 2006⁵). Desta forma, alterações nos níveis desse lipídio podem alterar o funcionamento de canais iônico e consequentemente a excitabilidade cerebral. Estudos também têm relatado que o colesterol é essencial para a plasticidade neuronal (Mauch, 2001⁶; Goritz, et al., 2002⁷; Klopfenstein, et al., 2002⁸; Barres e Smith; 2001⁹).

Os níveis orgânicos de colesterol são mantidos pela produção celular e pelo seu fornecimento na dieta. Dietas ricas em colesterol e gorduras saturadas, a dieta ocidental, vêm sendo cada vez mais consumidas (Vitali; Wellington e Calabresi, 2014¹⁰). Além das consequências mais conhecidas dessa dieta, como obesidade e elevados níveis de colesterol e triglicerídeos, alguns estudos vem relacionando seu consumo a doença de Alzheimer e a e outras formas de transtorno cognitivo (Di Paolo e Kim, 2011¹¹). Sendo o cérebro um órgão rico em lipídios, no qual esses lipídios estão diretamente

associados a sua estrutura e função elétrica, é de se esperar que alterações nos níveis lipídicos das dietas possam interferir em toda dinâmica cerebral acarretando em alterações na excitabilidade desse tecido e consequentemente da atividade elétrica cerebral.

Uma das formas mais utilizadas para analisar a atividade elétrica cerebral é o eletrocorticograma (ECoG), que registra a variação de voltagem no cérebro no decorrer do tempo. Os potenciais pós-sinápticos e de ação em uma população de neurônios são responsáveis pela atividade elétrica detectada pelo ECoG. Apesar desses registros parecerem aleatórios, é possível identificar ritmos cerebrais que variam de acordo com a área cerebral e com estado emocional e de consciência. Os ritmos cerebrais mais importantes são: delta (0,5-4 Hz); teta (4-8 Hz); alfa (8-14 Hz); e beta (14-30 Hz) (Guyton, 2002¹²; Pessoa, 2015¹³). Quanto maior a contribuição das ondas de maior frequência, mais acelerada se encontra a atividade cerebral, ou seja, mais excitada. Alterações nessa atividade elétrica podem indicar condições patológicas, como a epilepsia (Guyton, 2002¹²).

A epilepsia é uma doença neurológica caracterizada como uma hiperexcitabilidade sincrônica e recorrente (Cukiert, 2006¹⁴). Desta forma, os portadores de epilepsia são mais sensíveis a alterações na excitabilidade cerebral. Apesar de todo o conhecimento sobre a atuação do colesterol do cérebro, estudos ainda divergem sobre a ação de dietas ricas em lipídios na excitabilidade cerebral em indivíduos saudáveis e em portadores de epilepsia. Algumas dietas ricas em lipídios, como a dieta cetogênica, são indicadas como tratamento alternativo para epilepsia, a fim de diminuir a excitabilidade excessiva característica da doença (Nordli jr et al, 1997¹⁵; Nordli, 2002¹⁶; Kossoff, 2004¹⁷). Porém, outros estudos indicam que o excesso de colesterol cerebral pode levar a morte neuronal de interneurônios hipocámpais o que aumentaria a excitabilidade cerebral (Chali, et al., 2015¹⁸). Diante dessas divergências, esse trabalho visa avaliar a interferência de dietas hipercolesterolêmicas na atividade elétrica cerebral tanto em indivíduos normais, como em portadores de epilepsia.

2. Materiais e métodos

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*, var. *albinus*) provenientes do biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Os animais foram mantidos em ambiente adequado com temperatura ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade (50%) controlada, em ciclo claro-escuro de 12 horas, com água e alimentação *ad libitum*. Os procedimentos foram realizados de acordo com as normas do Comitê de Ética no Uso de Animais (licença nº 103/2014 – CEUA/ UFRPE).

2.1. Desenho experimental

Os animais foram divididos em dois grupos: Grupo 1 (n=20), animais que se receberam apenas da dieta padrão de laboratório, ração comercial Presence® 7883. Grupo 2 (n=20), animais que se alimentaram da dieta hipercolesterolêmica (DHC) (25% de gordura suína e 75% de ração padrão) dos 60 aos 120 dias. Ao atingirem os 120 dias de idade, 10 animais de cada grupo foram destinados para análise histológica e os demais foram destinados ao registro da atividade elétrica cerebral.

2.2. Provas laboratoriais

Amostras de sangue (0,5 mL) coletadas em tubos com anticoagulante foram utilizadas para análise de triglicerídeos totais e colesterol total. A análise foi realizada com o auxílio do aparelho Accutrend® Plus (Roche) imediatamente após a coleta.

2.3. Análise histológica

Os animais foram divididos em 4 grupos para a análise histológica: Grupo 1: animais normonutridos. Grupo 2: animais normonutridos e submetidos ao *status epilepticus* por um período de três horas. Grupo 3: animais alimentados com a DHC. Grupo 4: animais alimentados com a DHC e submetidos ao *status epilepticus* por um período de três horas.

Após aprofundamento anestésico, os animais foram perfundidos com solução salina (NaCl 0,9%) e posteriormente, com formaldeído 10% em tampão fosfato (pH 7,4). Os cérebros dos animais foram removidos e fixados em solução tamponada de formaldeído 10%. Os cérebros foram seccionados em fragmentos de orientação coronal. Os fragmentos foram desidratados em concentrações crescentes de álcool etílico (70% ao P.A.), diafanizados em xilol, impregnados e incluídos em Paraplast Plus®.

Secções do hipocampo foram obtidas utilizando-se um micrótomo rotativo Leica®, com cortes de 4 micrometros, seriados, em um plano coronal, na altura do III ventrículo, equivalente a secção 21 (Bregma: -1.70 mm e nível 74). Os cortes obtidos foram corados com Cresil Violeta (coloração de Nissl). Fotomicrografias foram obtidas em um microscópio de luz Leica® em aumentos de 40X e 400X, com auxílio do software ImageJ® para avaliação histológica das regiões CA1, CA2, CA3, giro denteado e hilo do giro denteado da formação hipocampal.

2.4. Provas laboratoriais

Os níveis sanguíneos de triglicerídeos e colesterol total foram obtidos através das amostras de sangue (0,5 mL) dos animais. As amostras sanguíneas foram coletadas por meio de punção da veia caudal lateral com o auxílio de um cateter venoso Nº 24 em tubos com anticoagulante. A análise foi realizada utilizando-se o equipamento Accutrend® Plus (Roche) imediatamente após a coleta.

2.5. Procedimento cirúrgico para implante de eletrodo

Aos 115 dias de idade, os animais foram anestesiados com uma associação de cetamina (50 mg) e xilazina (20 mg), na dose de 0,1 mL/100 g de peso corporal, administrada por via intramuscular. Durante o procedimento cirúrgico, a temperatura corporal foi controlada em torno de $37,5 \pm 1^{\circ}\text{C}$ utilizando-se um aquecedor elétrico posicionado sob o animal. Após a tricotomia e anti-sepsia do campo cirúrgico a cabeça do animal foi fixada a base de um aparelho estereotático (Insight®). Com a cabeça do animal fixada,

foi realizada uma incisão longitudinal da pele expondo a área da linha média do crânio. Em seguida, foram realizados 2 orifícios de aproximadamente 2mm no hemisfério esquerdo utilizando-se uma broca odontológica. Em cada orifício foi posicionado um parafuso cirúrgico. Um parafuso foi posicionado na região parietal no córtex sensório-motor, cerca de 1,5 a 2,5 mm anterior e 1 a 2 mm lateral ao bregma, e o outro foi colocado sobre o osso frontal (eletrodo de referência). Para melhor fixação dos eletrodos foi utilizada resina acrílica, após a completa secagem da resina a pele foi suturada, expondo apenas os parafusos que serviram de eletrodo.

2.6. Registro da atividade elétrica cerebral

Após um período de sete dias, no qual se verificava a completa cicatrização da cirurgia, a atividade elétrica cerebral de cada animal foi registrada por um período de 1 h utilizando-se um aparelho EMG 410C (EMG System, Brasil) numa taxa de amostragem de 6000 S/s. Durante o registro do ECoG, os animais foram alocados em uma gaiola de Faraday (Pessoa, 2015¹³) para minimizar ruídos decorrentes da rede elétrica local. Cada animal teve sua atividade elétrica cerebral basal registrada por um período de 30 minutos (atividade basal). Após esse intervalo, o *status epilepticus* foi induzido através da administração de pilocarpina intraperitonealmente em uma dose de 350mg/Kg de peso e o registro prosseguiu por mais 30 minutos (*status epilepticus*). Finalizados os registros, os animais foram eutanasiados por meio de aprofundamento anestésico.

2.7. Análise dos registros de ECoG

Os registros do ECoG foram segmentados em janelas de 2 minutos. Os segmentos foram importados para o programa Matlab, no qual foi implementado o algoritmo para o cálculo do espectro de potência das ondas cerebrais do ECoG.

2.8. Transformada de Fourier e espectro de potência

A Transformada de Fourier (TF) torna possível o conhecimento da contribuição de cada componente de frequência presente numa série temporal.

A TF é calculada a partir da decomposição do sinal complexo oscilatório em suas frequências componentes. A função $F(f)$ é a transformada direta de Fourier da função temporal $F(t)$, que representa as amplitudes das várias frequências de ondas que constituem o sinal $F(t)$; passando uma informação no tempo para o domínio da frequência. Então, $F(f)$ representa o grau de participação das componentes frequenciais da função $F(t)$, conforme se pode observar na equação a seguir (Weisstein, 2004¹⁹)

$$F(f) = \int_{-\infty}^{\infty} f(t) e^{-i2\pi ft} dt$$

O quadrado da Transformada de Fourier do ECoG gera seu espectro de potência. A potência média obtida no espectro permite estimar a contribuição dos diferentes ritmos cerebrais no sinal ECoG. Formalmente, o espectro de potência para um sinal eletrofisiológico específico pode ser calculado como segue:

$$\overline{E}_{\omega} = \frac{\int_{f_s}^{f_e} |F(f)|^2 df}{\int_{f_s}^{f_e} df}$$

Onde $F(f)$ é a Transformada de Fourier é do sinal $f(t)$, aqui representado pelo ECoG. $\overline{E}_{\omega}$ é a energia do espectro de potência normalizado por um determinado intervalo de frequência $\omega = [f_s, f_e]$, aqui representado pelos diferentes ritmos (Machado et al., 2012²⁰).

2.9. Análise estatística

O delineamento estatístico foi realizado utilizando testes não-paramétricos. O teste de Wilcoxon foi utilizado para dados dependentes

(pareados) e o teste de Mann-Whitney foi utilizado para as amostras independentes (não pareadas). Os resultados foram expressos através de média $\pm$ desvio padrão. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos

3. Resultados

3.1. Peso corporal e níveis de lipídios plasmáticos

Os animais que se alimentaram com a DHC apresentaram níveis séricos de colesterol significativamente maiores que os animais normonutridos ($p=0,004$). Porém, os níveis de triglicerídeos e o peso corporal não diferiram significativamente.

Tabela 1. Ganho de peso (g), níveis séricos de triglicerídeos e colesterol (mg/dl) em ratos controle e alimentados com DHC por 60 dias.

	Peso	Triglicerídeo	Colesterol
Controle	366,20 $\pm$ 38,20	123,67 $\pm$ 12,40	152,4 $\pm$ 13,55 ^a
DHC	392,25 $\pm$ 38,05	127,31 $\pm$ 48,32	165,31 $\pm$ 6,84 ^b

Média $\pm$ desvio padrão. Diferentes letras na mesma linha representam diferença estatística significante.

3.2. Análise histológica

A análise histológica da formação hipocampal revelou que nos animais controle o *status epilepticus* provocou morte celular intensa, com vacuolização e desestruturação das camadas celulares, principalmente nas regiões CA1, CA2 e CA3 do hipocampo (Figura. 1). Foram encontradas necrose neuronal e células de *gitter*, responsáveis por fagocitar neurônios mortos (Figura.2). Durante o *status epilepticus*, as lesões celulares encontradas nos animais alimentados com a DHC foram semelhantes às encontradas no grupo controle (Figura 1).

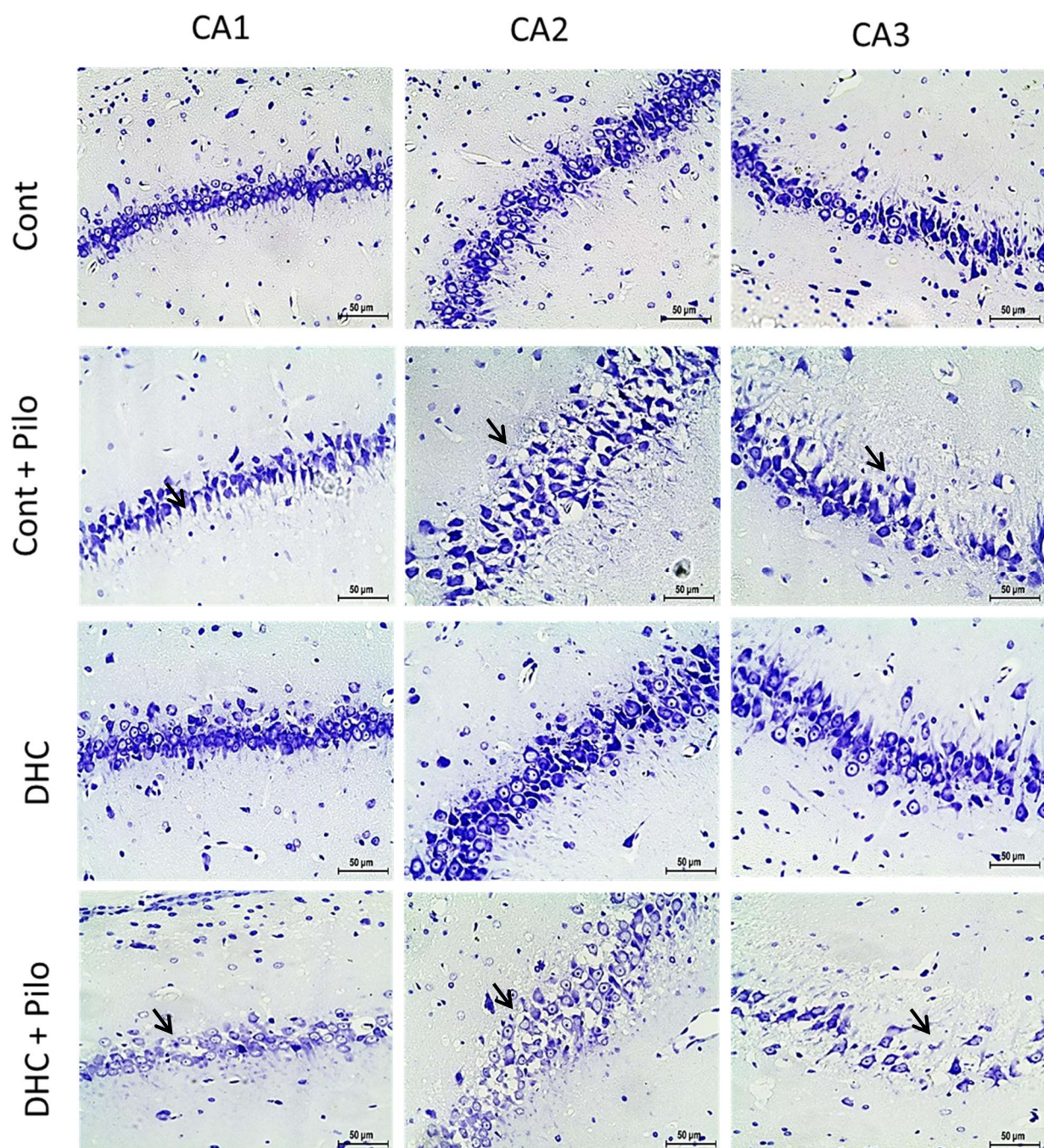


Figura 1. Fotomicrografias das regiões CA1, CA2 e CA3 do hipocampo de rato em secção coronal, de animais: controle (Cont); controle submetido ao status epilepticus (Cont + Pilo); alimentados com a dieta hipercolesterêmica (DHC); e alimentados com a DHC e submetidos ao status epilepticus(DHC + Pilo). Setas indicam vacuolização por morte neuronal. (Coloração: de Nissl).

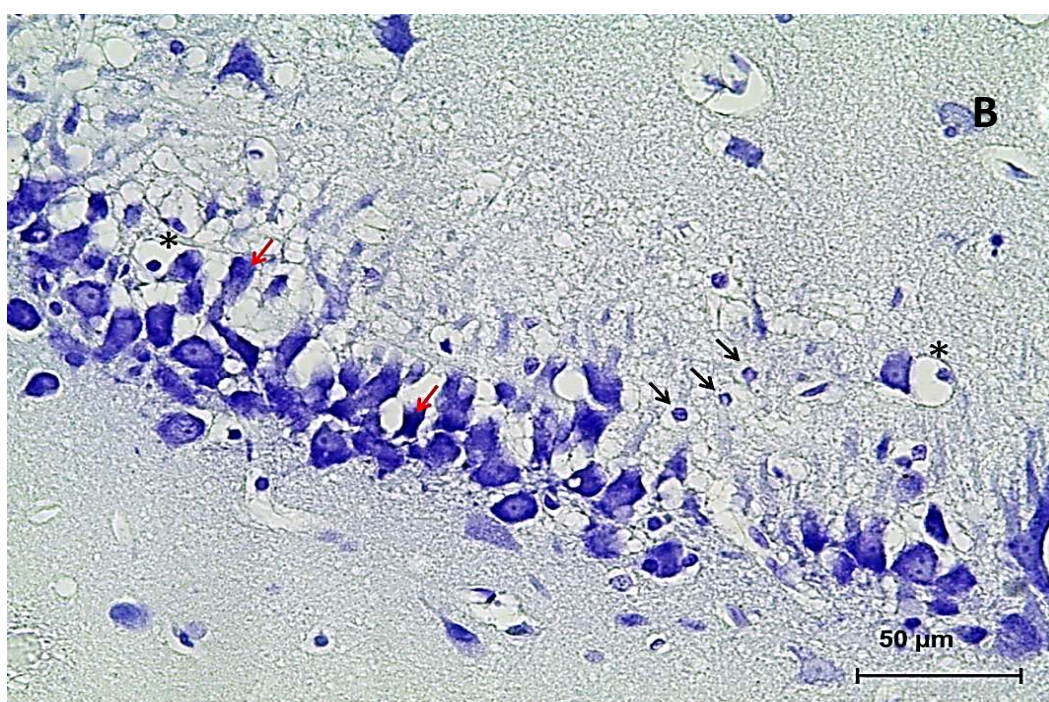
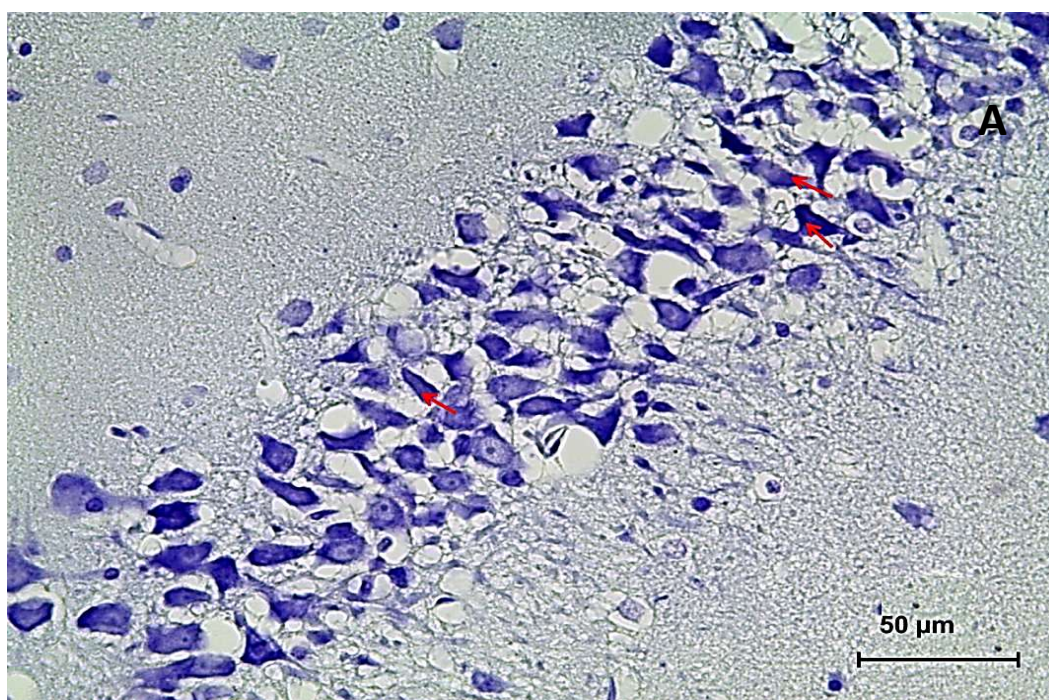


Figura 2. Fotomicrografias de secção coronal do hipocampo de animal controle tratado com pilocarpina evidenciando lesões decorrentes do *status epilepticus*. Marcações indicam células de *gitter* (setas pretas), morte neuronal (setas vermelhas) e neuroniofagia (asterisco preto). A Figura 2.A corresponde a região CA3 e a Figura 2.B corresponde a região CA2 do hipocampo (Coloração: Cresil violeta).

3.3. Atividade elétrica cerebral

O espectro de potência revelou que os animais que receberam a DHC apresentaram maior potência média da onda beta ($p=0,01$), onda mais rápida e diminuição da potência média da onda delta, onda mais lenta, em seu ECoG basal em comparação com os animais normonutridos (Figura 3) (Tab.2). Esse resultado indica que a suplementação lipídica com a DHC causou um aumento na excitabilidade cerebral. As ondas teta e alfa não apresentaram diferenças significativas.

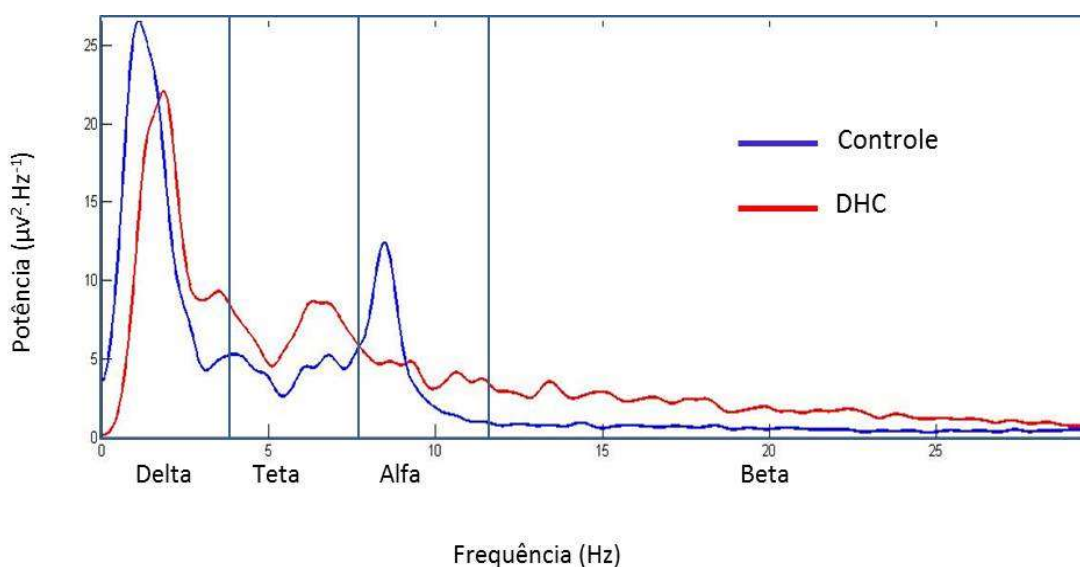


Figura 3. Espectro de potência da linha de base dos animais controle e alimentados com a DHC.

3.4. Status epilepticus

Após a aplicação da pilocarpina é possível observar no registro uma diminuição na amplitude das ondas e uma aumento na frequência (Figura. 4 B). Nesse período os valores do espectro de potência indicam aumento nos valores das ondas e teta e redução da onda delta. A esse período se segue o aparecimento periódico de ondas repetitivas de maior amplitude (Figura. 4 C),

essa alteração expressa uma diminuição da onda teta e aumento das ondas ainda mais rápidas, alfa e beta. Porém os valores das potências médias indicadas nesse trabalho para o *status epilepticus* é uma média de todos os valores. Esses valores indicaram um aumento da onda beta e uma diminuição da onda delta, o que indica o aumento da excitabilidade durante o *status epilepticus*.

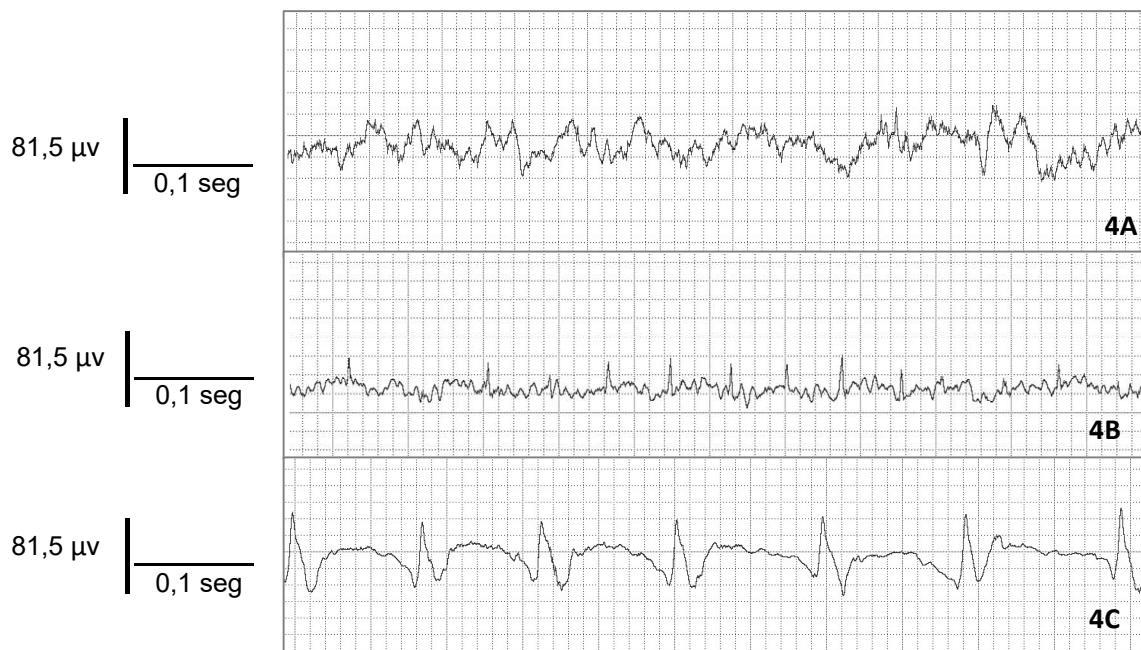


Figura 4. Registro de ECoG de animais antes do SE (linha de base) (4A) e durante o SE (4B e 4C). 1B mostra a primeira manifestação do SE e 1C ondas epileptiformes que intercalam momentos como os mostrados em 1B no decorrer do registro.

Nos animais alimentados com DHC durante o *status epilepticus* foram observados valores ainda maiores da onda beta ($p=0,01$), em relação a sua linha de base (Tab.2), mostrando um aumento ainda maior da excitabilidade cerebral nessa condição.

Durante o *status epilepticus*, a comparação entre os grupos experimentais mostrou que o grupo que recebeu DHC apresentou maiores

valores para onda alfa ($p=0,01$) e beta ($p=0,04$) em relação aos animais normonutridos (Tab.2, Figura.5). Esse resultado indica que a pilocarpina desencadeou uma resposta excitatória mais pronunciada nos animais alimentados com a DHC.

Tabela 2. Valores da potência média ($\mu\text{V}^2.\text{Hz}^{-1}$) das diferentes ondas cerebrais nos animais controle e alimentados com dieta hipercolesterolêmica, antes e durante o *status epilepticus*.

Grupo	Delta		Teta		Alfa		Beta	
	Basal	SE	Basal	SE	Basal	SE	Basal	SE
Controle	13,60± 2,28 ^a	10,96± 3,24	6,49± 1,75	7,32± 2,02	2,46± 0,70	2,59± 0,77 ^a	0,85± 0,16 ^a	1,21± 0,31 ^a
DHC	10,63± 1,65 ^b	8,52± 2,44	7,17± 1,66	8,71± 2,59	3,21± 0,65	3,60± 1,15 ^b	1,13± 0,23 ^b	1,58± 0,40 ^b

Média ± desvio padrão. Diferentes letras na mesma coluna para a mesma onda representam diferença estatística significativa.

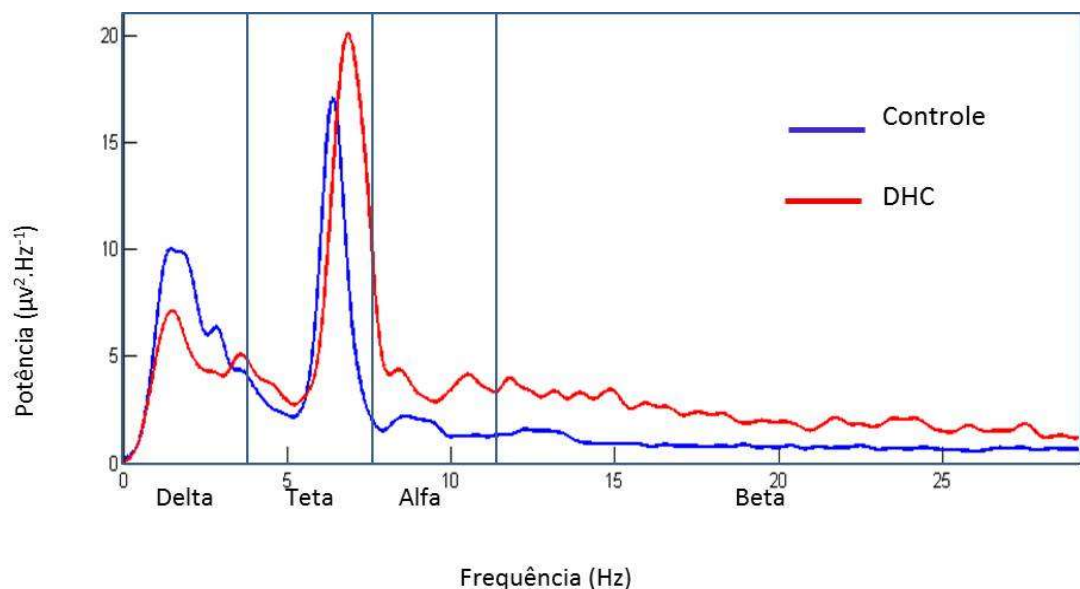


Figura 5. Espectro de potência de animais normonutridos e alimentados com a DHC durante o *status epilepticus*.

4. Discussão

4.1. Análise histológica

A morte neuronal na região hipocampal, principalmente na região CA1, CA2 e CA3, causada pelo *status pilepticus* induzido pela pilocarpina relatada nesse trabalho já é bem descrito na literatura (Ferrari, et al., 2008²¹). Nos animais alimentados com a DHC as lesões hipocampais decorrentes do *status epilepticus* também apresentaram alto nível de severidade. Todavia, os métodos de análises empregadas nesse trabalho não indicaram lesões provenientes unicamente do consumo da DHC, como relatado por Chali e colaboradores, 2015¹⁸.

A pilocarpina é um agonista colinérgico muscarínico. A ideia aceita, com base em estudos experimentais, é que a ativação do sistema colinérgico ative os neurônios excitatórios glutamatérgicos, dando início ao *status epilepticus*. A liberação sináptica excessiva de glutamato apresenta efeito excitotóxico, mantendo a célula despolarizada, o que aumenta o influxo de cálcio no neurônio levando a morte celular (Choi et al., 1987²²). Dessa forma, o *status epilepticus* e morte neuronal não se dá pelo efeito tóxico da pilocarpina, mas pelo efeito do excesso da liberação de glutamato que ela provoca, sendo este efeito excitotóxico. Esse mecanismo é apontado como causador do *status epilepticus* e consequente morte neuronal causadora da esclerose hipocampal em pacientes portadores de epilepsia.

4.2. Influência da suplementação lipídica na atividade elétrica basal

O aumento da potência média da onda beta, onda mais rápida, no ECoG basal dos animais que receberam a DHC indica uma maior atividade cerebral. Devido aos vários níveis de atuação do colesterol no sistema nervoso, é difícil inferir o mecanismo pelo qual o colesterol elevou a atividade cerebral. Todavia, algumas hipóteses podem ser propostas.

O colesterol apresenta núcleo com estrutura plana e rígida que interage hidrofobicamente com as cadeias de ácidos graxos dos fosfolipídios, o que diminui a fluidez da membrana plasmática, sendo desta forma, importante para

estrutura neuronal e consequentemente para a estruturação sináptica (Zhang e Liu, 2014¹). A suplementação de colesterol neste trabalho pode também ter favorecido a transmissão sináptica, uma vez que essa transmissão é dependente de colesterol, o que explicaria o aumento da atividade cerebral (Martín, Pfrieder e Dotti, 2014²³). É razoável também, pensar que o aumento na quantidade de colesterol na bainha de mielina, região com maior concentração de colesterol no cérebro, pode ter potencializado seu papel como isolante elétrico. Assim, este aumento do conteúdo lipídico da bainha de mielina poderia aumentar a velocidade de propagação dos potenciais pós-sinápticos e de ação, o que também explicaria a aceleração da atividade elétrica cerebral demonstrada nesse trabalho (Moyes e Schulte, 2010²⁴).

Chali e colaboradores (2015)¹⁸ também observaram que o aumento dos níveis de colesterol cerebral causou o aumento da atividade cerebral, e relacionaram esse aumento a morte de interneurônios inibitórios e aumento na expressão da proteína tau. Porém os métodos empregados neste estudo não foram capazes de identificar lesões decorrentes unicamente do consumo da DHC.

Pessoa e colaboradores (2015)¹³ mostraram que em animais anestesiados que se alimentaram de DHC a atividade cerebral foi menor quando comparados aos animais normonutridos. Porém, após a indução do *status epilepticus*, pela administração da pilocarpina, essa diferença não se manteve. Esses achados podem indicar que os animais alimentados com a DHC respondem mais eficazmente a anestesia, todavia, ao se administrar a pilocarpina, esses animais responderam prontamente, mostrando níveis de excitabilidade semelhantes aos normonutridos.

Os estudos realizados por Pessoa e colaboradores (2015)¹³ indicam que os animais alimentados com a DHC respondem mais eficazmente a anestesia, mostrando, nessa situação, menor excitabilidade cerebral quando comparados aos animais normonutridos, todavia, ao se administrar a pilocarpina, esses animais responderam prontamente, mostrando níveis de excitabilidade semelhantes aos normonutridos. Este trabalho mostra que nos

animais em vigília o colesterol aumentou a excitabilidade cerebral e esse aumento foi ainda maior durante o *status epilepticus*.

4.3. Influência da suplementação lipídica durante *status epilepticus*

O aumento nas ondas mais rápidas em detrimento das ondas mais lentas evidenciados no espectro de potência, durante o *status epilepticus*, indica a hiperexcitabilidade cerebral característica das crises epiléticas (Priel, 1996²⁵; Pessoa, 2015¹³). A DHC também causou aumento da excitabilidade cerebral, desta forma, nos animais alimentados com a DHC a excitabilidade durante o *status epilepticus* foi ainda mais expressiva.

A DHC foi capaz de aumentar a atividade elétrica cerebral sem causar danos neuronais aparentes. Porém, estudos são necessários a fim de entender os efeitos desse fenômeno na saúde de pessoas saudáveis. O efeito de DHC nas ondas cerebrais foi semelhante ao encontrado no espectro de potência dos animais durante o *status epilepticus*. E quando o animal apresentava as duas situações simultaneamente, uma aceleração ainda maior da atividade elétrica cerebral pôde ser observada. Durante a epilepsia, as convulsões só são estabelecidas quando a excitação neuronal excede um limiar crítico. Considerando que indivíduos que se alimentam de dietas ricas em colesterol e gorduras saturadas apresentem uma maior excitabilidade cerebral, essa condição pode favorecer a ultrapassagem desse limiar crítico em pacientes epiléticos e assim favorecer a manifestação de crises epiléticas. Desta forma, podendo representar um fator de risco para os portadores de epilepsia.

Devido ao grande aumento no consumo dessas dietas ricas em colesterol e gorduras saturadas, e seu claro efeito na atividade elétrica cerebral, é de grande importância o desenvolvimento de estudos que visem avaliar o impacto desse tipo de alimentação na saúde. Algumas doenças neurológicas já estão sendo associadas a problemas no metabolismo no colesterol, como a doença de Alzheimer e a doença de Niemann–Pick do tipo C mostrando alterações em sua atividade elétrica cerebral (Sevin, et al., 2007²⁶; Panchal et al., 2010²⁷; Di Paolo e Kim, 2011). Dessa forma, é importante estudos a fim de analisar a interferência do colesterol consumido na dieta na

atividade elétrica cerebral de indivíduos saudáveis e de indivíduos mais sensíveis às alterações dessa atividade elétrica, como os portadores de epilepsia.

5. Conclusão

A DHC causou o aumento nos níveis sanguíneos de colesterol. O excesso de colesterol causou o aumento excitabilidade cerebral sem que fossem identificados danos neuronais. Porém, devido ao aumento na excitabilidade gerado pela DHC, quando submetidos ao *status epilepticus* os animais que receberam essa dieta apresentaram níveis de excitabilidade ainda mais elevados que os animais normonutridos. Desta forma, pôde se observar que a DHC favoreceu uma maior severidade do *status epilepticus*.

Referências

1. Zhang J, Liu Q. REVIEW - Cholesterol metabolism and homeostasis the brain. *Protein Cell* 2015; 6(4):254–64.
2. Björkhem I, Meaney S, Fogelman AM. Brain cholesterol: long secret life behind a barrier. *Arterioscler Thromb Vasc Bio* 2004; 24:806–15.
3. Dietschy JM, Turley SD. Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. *J Lipid Res* 2004; 45(8):1375-97.
4. Burger K, Gimpl G, Fahrenholz F., Regulation of receptor function by cholesterol. *Cell Mol Life Sci* 2000; 57:1577–92.
5. Pucadyil TJ, Chattopadhyay A. Role of cholesterol in the function and organization of G-protein coupled receptors. *Prog. Lipid Res* 2006; 45:295–333.
6. Mauch DH, Nagler K, Schumacher S, Göritz C, Müller EC, Otto A, Pfrieder FW. CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol. *Science* 2001; 294:1354–7.
7. Goritz C, Mauch DH, Nagler K, Pfrieder FW. Role of glia-derived cholesterol in synaptogenesis: new revelations in the synapse–glia affair. *J Physiol Paris* 2002; 96:257–63.
8. Klopfenstein DR, Tomishige M, Stuurman N, Vale RD. Role of phosphatidylinositol(4,5) bisphosphate organization in membrane transport by the Unc104 kinesin motor. *Cell* 2002; 109:347–58.
9. Barres BA, Smith J. Cholesterol – Making or breaking the synapse. *Science* 2001; 294:1297-98.
10. Vitali C, Wellington CL, Calabresi L. HDL and cholesterol handling in 439 the brain. *Cardiovasc Res* 2014; 103(3):405–13.
11. Di Paolo G, Kim TW. Linking lipids to Alzheimer’s disease: cholesterol and beyond. *Nat Rev Neurosci* 2011; 12:284–96.
12. Guyton A C. Tratado de Fisiologia Médica. 10ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2002.

13. Pessoa DT, Cruz R, Machado B, Tenorio B, Nogueira R. Analysis of electrocorticographic patterns in rats fed standard or hyperlipidic diets in a normal state or during *status epilepticus*. Nutr Neurosci 2015. DOI<http://dx.doi.org/10.1179/1476830515Y.00000000033>
14. Cukiert A. Epilepsias generalizadas. Ed. Segmento Farma, 2006.
15. Nordli JR DR de V. The ketogenic diet revisited: back to the future. Epilepsia 1997; 38:743-9.
16. Nordli D. The ketogenic diet: uses and abuses. Neurology 2002; 58(7):21-4.
17. Kossoff EH. More fat and fewer seizures: dietary therapies for epilepsy. The Lancet Neurol 2004; 3(7):415-20.
18. Chali F, Djelti F, Eugene EL, Valderrama M, Marquer C, Aubourg P, Duykaerts C, Miles R, Cartier N, Navarro V. Inhibiting cholesterol degradation induces neuronal sclerosis and epileptic activity in mouse hippocampus. Eur J Neurosci 2015; 41(10):1345-55.
19. Weisstein EW. Fourier Transform. MathWorld, A Wolfram Web Resource. 2004.
20. Machado BS. Determinismo e Estocasticidade em Séries Temporais Empíricas. Dissertação. Instituto de Física Teórica, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2003.
21. Ferrari D, Cysneiros RM, Scorza CA, et al. Neuroprotective activity of omega-3 fatty acids against epilepsy-induced hippocampal damage: quantification with immunohistochemical for calcium-binding proteins. Epilepsy Behav 2008; 13:36–42.
22. Choi DW, Mauluccigedde M, Kriegstein AR. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. J Neurosci 1987; 7(2):357-68.
23. Martín MG, Pfrieger F, Dotti CG. Cholesterol in brain disease: sometimes determinant and frequently implicated. EMBO reports 2014; 15(10):1036–52.

24. Moyes CD, Schulte P M. Princípios de Fisiologia Animal, Artmed, 2ª ed., 2010.
25. Priel MR, Santos NF, Cavalheiro EA. Developmental aspects of the pilocarpine model of epilepsy. *Epilepsy Res* 1996; 26:115-21.
26. Sevin M, Lesca G, Baumann N, Millat G, Lyon-Caen O, Vanier MT, Sedel F. The adult form of Niemann-Pick disease type C. *Brain* 2007;130:120–33, 2007.
27. Panchal M, Loeper J, Cossec JC, Perruchini C, Lazar A, Pompon D, Duyckaerts C. Enrichment of cholesterol in microdissected Alzheimer's disease senile plaques as assessed by mass spectrometry. *J Lipid Res* 2010; 51:598–605.

CONCLUSÃO

A suplementação lipídica aumentou a excitabilidade cerebral, tanto a baseada em uma em uma dieta rica em colesterol, como quando essa suplementação foi realizada com ácidos graxo poli-insaturados da família ômega-3. O *status epilepticus*, como esperado, causou o aumento da excitabilidade cerebral em todos os animais independente da dieta. Porém, nos animais que receberam a DHC essa excitabilidade foi ainda maior. O *status epilepticus* causou morte neuronal principalmente nas regiões hipocampais. Mas nos animais que receberam a suplementação com ômega-3 esses danos foram muito discretos ou inexistentes. Desta forma, embora os dois tipos de suplementação lipídica tenha aumentado a atividade elétrica basal, o ômega-3 mostrou efeito neuroprotetor, enquanto a DHC aumentou a severidade do *status epilepticus*.