

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
FACULDADE DE NUTRIÇÃO
MESTRADO EM NUTRIÇÃO**

**EFEITOS DA DIETA CETOGÊNICA À BASE DE
TRINANTINA NOS EPISÓDIOS CONVULSIVOS DE
RATOS PORTADORES DE EPILEPSIA INDUZIDA POR
PILOCARPINA**

TÂMARA KELLY DE CASTRO GOMES

MACEIÓ-AL

2011

TÂMARA KELLY DE CASTRO GOMES

**EFEITOS DA DIETA CETOGÊNICA À BASE DE
TRIENTANTINA NOS EPISÓDIOS CONVULSIVOS DE
RATOS PORTADORES DE EPILEPSIA INDUZIDA POR
PILOCARPINA**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Nutrição da Universidade Federal de
Alagoas como pré requisito para a obtenção
do título de Mestre em Nutrição.

Orientadora: Prof^a Dr^a Suzana Lima de Oliveira
Faculdade de Nutrição
Universidade Federal de Alagoas

Co-orientador: Prof^o Dr. Euclides Maurício Trindade Filho
Departamento de Fisiologia Humana
Universidade de Ciências da Saúde do Estado de Alagoas

MACEIÓ-AL

2011

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

G633e Gomes, Tâmara Kelly de Castro.
Efeitos da dieta cetogênica à base de trienactina nos episódios convulsivos de ratos portadores de epilepsia induzida por pilocarpina / Tâmara Kelly de Castro Gomes. – 2011.
67 f.

Orientadora: Suzana Lima de Oliveira.
Co-Orientador: Euclides Maurício Trindade filho.
Dissertação (mestrado em Nutrição) – Universidade Federal de Alagoas. Faculdade de Nutrição. Maceió, 2011.

Inclui bibliografia.

1. Dieta cetogênica. 2. Triacilglicerol de cadeia média. 3. Trienactina. 4. Lobo temporal. 5. Epilepsia. I. Título.

CDU: 612.39:616.853



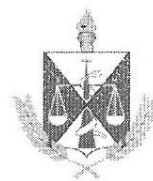
UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
FACULDADE DE NUTRIÇÃO
MESTRADO EM NUTRIÇÃO

Campus A. C. Simões

BR 104, km 14, Tabuleiro dos Martins

Maceió-AL 57072-970

Fone/fax: 81 3214-1160



PARECER DA BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

***EFEITOS DE DIETA CETOGÊNICA À BASE DE TRIENANTINA
NOS EPISÓDIOS CONVULSIVOS DE RATOS PORTADORES DE
EPILEPSIA INDUZIDA POR PILOCARPINA***

por

Tâmara Kelly de Castro Gomes

A Banca Examinadora, reunida aos 15 dias do mês de fevereiro de 2011, considera a candidata APROVADA.

Profa. Dra. Suzana Lima de Oliveira
Faculdade de Nutrição – Universidade Federal de Alagoas
(Orientadora)

Prof. Dr. Raul Manhães de Castro
Departamento de Nutrição – Universidade Federal de Pernambuco
(Examinador)

Prof. Dr. Daniel Leite Góes Gitai
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde – Universidade Federal de Alagoas
(Examinador)

***Dedico ao meu amado e
saudoso pai Antônio Avelar,
fonte de inspiração inigualável.***

AGRADECIMENTOS

O capítulo mais importante dessa dissertação é sem dúvida o de agradecimentos, pois sem a ajuda dessas “pessoas” esse trabalho não teria sido possível.

Em primeiro lugar gostaria de agradecer a Deus. Quanto mais leio e me interesso por ciência, principalmente a neurociência, mais me convenço que Ele existe. Sou imensamente grata por todas as oportunidades que me foram concedidas, pela minha disposição, motivação e pela minha saúde física e mental para chegar até o fim dessa primeira grande jornada em minha vida acadêmica. *“Quem cuidou de mim foi Deus com seu amor de Pai...”*

À UFAL por ter me oferecido sua estrutura física e os docentes.

À Faculdade de Nutrição pelo curso de pós-graduação, pelos técnicos, pelas oportunidades.

À Universidade de Ciências da Saúde do Estado de Alagoas (UNCISAL) por ter me concedido sua estrutura física para eu desenvolver toda parte experimental do meu trabalho.

Ao Biotério da UNCISAL, especialmente ao Marcelo e à querida “Beta”, por terem tornado a burocracia tão mais simples e terem me cedido os animais.

À minha orientadora Suzana Oliveira obrigada por todos esses anos de orientação e amizade que você me concedeu. Eu não tenho palavras para expressar a grandeza que você representa em minha vida. Você sempre foi para mim muito mais que orientadora e eu sempre tive orgulho de pensar assim. Obrigada por acreditar em mim, algumas vezes até mais que eu mesma! São muitos anos de convivência e levarei comigo, para onde quer que eu vá seu exemplo, sua dedicação, sua ética. Obrigada por todas as

oportunidades que você sempre me ofereceu. A única tristeza desse momento é deixá-la, aprendi a ter você por perto desde a época em que era ainda uma graduanda do curso de Nutrição, meio sem saber qual caminho tomar. Vou pensar que essa “separação” é por pouco tempo, assim não fico triste nesse momento de alegria!

Aos mestres Euclides Maurício e Terezinha Ataíde todo meu mais sincero agradecimento. Professor Euclides, meu co-orientador, agradeço os valiosos ensinamentos, as conversas sempre tão frutíferas. Professora Terezinha, minha “orientadora” por opção! Sempre soube que podia contar com a senhora, sempre me encantou com sua facilidade de falar de coisas complexas, sempre admirei a calma e paciência e claro, toda a bagagem científica. Obrigada por tudo professora! Será sempre a querida professora Terezinha!

A todos os professores do curso de pós-graduação em Nutrição por terem compartilhado comigo seus conhecimentos. Em especial, ao Professor Cyro Rêgo pelo apoio valioso nas análises estatísticas.

À minha família (Teixeira de Castro, Rebêlo Gomes e porque não Cavalcante...). Ao meu pai Antônio Avelar Rebêlo Gomes (*In memoriam*) por tudo! Por todo amor, confiança, orgulho, carinho, por todo investimento financeiro em minha formação, sobretudo por ter me ensinado a seguir enfrente, a lutar pelos meus objetivos e por sempre ter respeitado todas as minhas decisões. Jamais esquecerei todos os ensinamentos que ele me passou, às vezes quando eu tinha medo e ele me dava segurança, os diversos momentos onde me ajudou a tomar a direção certa. Que bom que eu pude te conhecer, que sou sua filha... *“Não sei porque você se foi, quanta saudade eu senti e de tristezas vou vivendo e aquele adeus não pude dar”*.

À minha querida e amada mãe Zuleide Teixeira, que me presenteia todos os dias com sua doçura e paciência inesgotáveis. A você que sempre respeitou minhas opções, pode não entender muito, mas, sempre quis me ver feliz, obrigada por tudo. Desculpa se fiz a opção mais difícil para minha vida, mas, estou feliz e sei que você fica feliz por isso.

Ao meu bem, amor, amigo e companheiro de muitos anos Marcelo Cavalcante. Por me presentear com sua companhia, sua amizade. Agradeço por tudo que vivemos, que compartilhamos, que construímos, por todo apoio oferecido sempre de forma gratuita e, principalmente, pelo amor, pelas lindas palavras e pelo valioso sorriso. Pelo que passamos e que ainda vamos passar juntos, obrigada!

Aos meus avós maternos José Teixeira (*In memoriam*) e Iraci pelo apoio moral, financeiro e pela confiança que sempre depositaram em mim; à minha tia Vane agradeço por toda torcida, pelo orgulho que ela sempre disse ter de mim.

Agradeço a toda minha família paterna, à minha irmã Micheline; à Helena, minha mais que madrastra, obrigada por me ajudar em todos os momentos; a minha avó paterna Nair Rebêlo, não tenho palavras para dizer o quanto a senhora representa em minha vida; à querida tia-avó Carminha, agradeço as preces, o amor, acolhimento e a sinceridade; aos tios e tias, primos e primas e a todos os agregados da minha família, muito obrigada por todo apoio e por toda torcida, agradeço especialmente as preces.

Aos amigos Allysson Haide e Valéria Nunes (Lela) por terem estado comigo, por terem me provado que nas carteiras e corredores da Universidade podem sim surgir amizade verdadeira. Agradeço a Deus por ter me presenteado com a amizade de vocês. Allysson, muito obrigada por ter me ensinado a “temida”

punção cardíaca. Você contribuiu de fato com este trabalho! Lela, obrigada por fazer parte da minha história, você é uma irmã!

Às minhas colaboradoras da iniciação científica o meu muitíssimo obrigada! Esse trabalho é nosso! Tacy, Isabelle, Jaqueline, Laura, Wanessa, Jéssica e Estela, sou muito grata a vocês por todo apoio, por terem me ajudado na luta, por terem cuidado tão bem dos nossos ratinhos.

À técnica do laboratório Elenita Marinho, sem sua disposição em ajudar tudo seria mais difícil. Obrigada por ter estado comigo, por ter me ajudado em todos os sacrifícios dos animais, por ter me aconselhado, por ter sido minha fiel companheira.

À Elisabete Rêgo, minha companheira de luta! Agradeço por todo investimento na implantação do nosso “metódico” protocolo. Agradeço, sobretudo por ter trazido a linha de pesquisa para a gente.

Aos colegas de turma, agradeço por todo apoio, por toda torcida. Em especial, à Dani Araújo, ao João Batista, à Sarah Gurgel e à Fernanda Leite. Sou feliz por ter vivido com vocês essa fase tão feliz de minha vida!

Aos animais, o meu sincero respeito e agradecimento!

Finalmente, à Fundação de Apoio à Pesquisa do estado de Alagoas (FAPEAL) pela concessão da bolsa de mestrado.

A todos que de alguma forma participaram desta fase em minha vida!

*“De tudo ficaram três coisas:
A certeza de que estamos sempre começando...
A certeza de que precisamos continuar...
A certeza de que seremos interrompidos...
Portanto, devemos fazer da interrupção um caminho novo...
Da queda, um passo de dança...
Do medo, uma escada...
Do sonho, uma ponte...
Da procura, um encontro...”*

Fernando Pessoa

RESUMO GERAL

GOMES, T.K. de C. Universidade Federal de Alagoas, fevereiro de 2011. **Efeitos da dieta cetogênica à base de trienantina nos episódios convulsivos de ratos portadores de epilepsia induzida por pilocarpina.** Orientadora: Prof^a Dr^a Suzana Lima de Oliveira. Co-orientador: Prof. Dr. Euclides Maurício Trindade Filho.

A principal importância da epilepsia do lobo temporal decorre de sua alta prevalência e elevada proporção de pacientes com crises epiléticas refratárias ao tratamento medicamentoso, fazendo-se necessário, neste caso, o uso de terapias alternativas, como a dieta cetogênica. Esta dieta é rica em lipídeos, pobre em carboidratos e proteínas e desde 1921 tem sido utilizada para pacientes não responsivos à terapia medicamentosa. A presente dissertação trata da investigação dos efeitos da dieta cetogênica à base de trienantina nos episódios convulsivos de ratos epiléticos e foi desenvolvida na forma de dois artigos. O primeiro artigo, *O papel da dieta cetogênica no estresse oxidativo presente na epilepsia*, apresenta uma revisão sobre a relação existente entre o estresse oxidativo e a epilepsia, destacando o possível efeito benéfico da dieta cetogênica neste contexto. Vários resultados atestam que, de fato, esta modalidade dietética diminui os marcadores de estresse oxidativo. O segundo artigo, intitulado *Efeitos da dieta cetogênica à base de trienantina nos episódios convulsivos de ratos portadores de epilepsia induzida por pilocarpina*, descreve o estudo experimental, realizado em ratos *Wistar*, subdivididos em três grupos, denominados, segundo a dieta recebida, em Controle (dieta padrão AIN-93G), CetoTAGC₇ (cetogênico à base de trienantina; AIN-93G modificada para conter 4% de óleo de soja, 25,79% de trienantina e 40% de margarina) e CetoTAGsoja (cetogênico à base de soja; AIN-93G modificada para conter 29,79% de óleo de soja e 40% de margarina). A proporção lipídeos:carboidratos+proteína das dietas cetogênicas foi de 3,5:1 (dieta controle, 1:11,8) e o período experimental totalizou 19 dias. Verificou-se que o valor energético da cota de ração ingerida e o ganho de peso apresentado pelos três grupos, no período experimental, não foram diferentes ($P>0,05$). Não houve diferença significativa entre os três grupos, quanto ao coeficiente de eficiência alimentar ($P>0,05$). As análises comportamentais demonstraram que não houve diferença para a variável frequência de crises recorrentes espontâneas, entretanto a duração das crises dos animais pertencentes ao grupo da trienantina foi menor no último dia experimental. Pesquisas adicionais futuras são encorajadas, pois, os resultados do presente estudo apontam, ainda que modestamente, para um potencial efeito benéfico da trienantina no controle de crises epiléticas, que poderia ser investigado em condições diferentes, a exemplo de um período de tempo superior ao testado pelo presente protocolo de pesquisa.

Palavras-chave: dieta cetogênica, triacilglicerol de cadeia média, trienantina, epilepsia do lobo temporal.

GENERAL ABSTRACT

GOMES, T.K. de C. Federal University of Alagoas, february of 2011. **Effects of the ketogenic diet based on triheptanoin in seizures of rats with epilepsy induced by pilocarpine.** Advisor: Prof.^a Dr^a. Suzana Lima de Oliveira. Co-Advisor: Prof. Dr. Euclides Maurício Trindade Filho.

The main importance of temporal lobe epilepsy due to its high prevalence and high proportion of patients with refractory epilepsy to treatment, making it necessary in this case, the use of alternative therapies, such as the ketogenic diet. This diet is rich in fat, low in carbohydrates and proteins, and since 1921 has been used for patients unresponsive to medical therapy. This dissertation deals with the investigation of the effects of the ketogenic diet based on triheptanoin in epileptic seizures in rats and was developed in the form of two articles. The first article, *The role of the ketogenic diet on oxidative stress occurring in epilepsy*, presents a review of the relationship between oxidative stress and epilepsy, highlighting the possible beneficial effect of ketogenic diet in this context. Several results show that, in fact, this dietary method reduces oxidative stress markers. The second article, entitled *Effects of ketogenic diet based on triheptanoin in seizures of rats with epilepsy induced by pilocarpine*, describes the experimental study conducted in *Wistar* rats were divided into three groups, named according to the diet received, in control (standard diet AIN-93G), CetoTAGC₇ (ketogenic based in triheptanoin; AIN-93G diet modified to contain 4% soybean oil, 25.79% of triheptanoin and 40% margarine) and CetoTAGsoja (ketogenic based in soybean; AIN-93G diet modified to contain 29.79% of soybean oil margarine and 40%). The ratio lipid: carbohydrate + protein ketogenic diets was 3.5:1 (control diet, 1:11,8) and experimental period lasted 19 days. It was found that the energy value of the share of feed intake and weight gain made by the three groups during the experimental period were not different ($P > 0.05$). There was no significant difference among the three groups regarding the ratio of feed efficiency ($P > 0.05$). The behavioral analysis showed no difference for the variable frequency of spontaneous recurrent seizures, however the duration of the attacks of animals belonging to the group triheptanoin was lower in the last experimental day. Future additional research are encouraged, therefore, the results of this study indicate, however modestly, to a potential beneficial effect of triheptanoin to control seizures, which could be investigated under different conditions, like a period longer than is tested by this protocol.

Keywords: ketogenic diet, medium chain triglyceride, triheptanoin, temporal lobe epilepsy.

LISTA DE TABELAS

| | | Página |
|---|--|--------|
| <i>Efeitos da dieta cetogênica à base de trienantina nos episódios convulsivos de ratos portadores de epilepsia induzida por pilocarpina</i> | | |
| Tabela 1 | Composição das dietas Controle, CetoTAGsoja e CetoTAGC ₇ . | 45 |
| Tabela 2 | Valores de ingestão total, CEA e do consumo energético de ratos submetidos às dietas Controle, CetoTAGsoja e CetoTAGC ₇ . | 48 |
| Tabela 3 | Variação da frequência total no período (VFTP) e variação da duração total no período (VDTP) das crises recorrentes espontâneas dos grupos submetidos às dietas Controle, CetoTAGC ₇ e CetoTAGsoja. | 54 |

LISTA DE FIGURAS

| | Página |
|---|--|
| <i>Efeitos da dieta cetogênica à base de trienantina nos episódios convulsivos de ratos portadores de epilepsia induzida por pilocarpina</i> | |
| Figura 1 | Ganho de peso dos animais submetidos às dietas Controle, CetoTAGsoja e CetoTAGC ₇ , no período experimental de 19 dias. 47 |
| Figura 2 | Frequência total (número total em todo o período experimental) de crises recorrentes espontâneas (CRE) dos animais submetidos às dietas Controle, CetoTAGsoja e CetoTAGC ₇ . 49 |
| Figura 3 | Frequência diária média (número total de crises dividido pelo número de dias de experimento) de crises recorrentes espontâneas (CRE) dos animais submetidos às dietas Controle, CetoTAGsoja e CetoTAGC ₇ . 49 |
| Figura 4 | Frequência diária (número, por dia de observação) das crises recorrentes espontâneas (CRE) dos animais submetidos às dietas Controle, CetoTAGsoja e CetoTAGC ₇ . 50 |
| Figura 5 | Duração total (tempo total de crises, em segundos, durante todo o período experimental) das crises recorrentes espontâneas (CRE) dos animais submetidos às dietas Controle, CetoTAGsoja e CetoTAGC ₇ . 51 |
| Figura 6 | Duração média (tempo total de crises, em segundos, dividido pelo número de dias de observação) das crises recorrentes espontâneas dos animais submetidos às dietas Controle, CetoTAGsoja e CetoTAGC ₇ . 52 |
| Figura 7 | Duração total diária (tempo total de crises, por dia de observação) das crises recorrentes espontâneas (CRE) dos animais submetidos às dietas Controle, CetoTAGsoja e CetoTAGC ₇ . 52 |
| Figura 8 | Duração média diária (duração total dividida pelo número de crises, por dia de observação) das crises recorrentes espontâneas dos animais submetidos às dietas Controle, CetoTAGsoja e CetoTAGC ₇ . 53 |

LISTA DE ABREVIATURAS

- DC:** dieta cetogênica
- TCL:** triacilglicerol de cadeia longa
- TCM:** triacilglicerol de cadeia média
- GABA:** ácido γ -aminobutírico
- PTZ:** pentalenotetrazol
- CAC:** Ciclo do Ácido Cítrico
- CetoTAGC₇:** grupo de dieta cetogênica à base de trienantina
- CetoTAGSoja:** grupo de dieta cetogênica à base de óleo de soja
- CEA:** coeficiente de Eficiência Alimentar
- FAPEAL:** Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Alagoas
- UFAL:** Universidade Federal de Alagoas
- ATP:** trifosfato de adenosina
- EROs:** espécies reativas de oxigênio
- ELT:** epilepsia do lobo temporal
- SE:** *status epilepticus*
- NMDA:** N-metil-D-aspartato
- SERCA:** cálcio ATPase do retículo sarcoplasmático
- PMCA:** cálcio ATPase da membrana plasmática
- AMPA:** receptor do ácido α -amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxalepropiônico
- IL:** interleucina
- TNF- α :** fator de necrose tumoral- α
- iNOS:** óxido nítrico sintase induzida
- PG:** prostaglandina
- SOD:** superóxido dismutase
- SNC:** sistema nervoso central
- ERN:** espécies reativas de nitrogênio
- ADP:** difosfato de adenosina
- Pi:** fosfato inorgânico
- CAT:** catalase
- MDA:** malonaldeído

SUMÁRIO

| | Página |
|---|--------|
| 1 INTRODUÇÃO GERAL | 1 |
| 2 ARTIGOS | |
| 2.1 ARTIGO DE REVISÃO: <i>A dieta cetogênica e o estresse oxidativo presente na epilepsia</i> | 3 |
| Resumo | 3 |
| Abstract | 3 |
| Introdução | 5 |
| Método | 7 |
| A epilepsia | 8 |
| O estresse oxidativo na epilepsia | 15 |
| Dieta cetogênica e estresse oxidativo | 24 |
| Considerações Finais | 30 |
| Referências | 30 |
| 2.2 ARTIGO DE RESULTADOS: <i>Efeitos da dieta cetogênica à base de trienantina nos episódios convulsivos de ratos portadores de epilepsia induzida por pilocarpina</i> | 39 |
| Resumo | 39 |
| Abstract | 40 |
| Introdução | 41 |
| Material e Métodos | 43 |
| Resultados | 47 |
| Discussão | 54 |
| Considerações Finais | 60 |
| Referências | 60 |
| 3 CONSIDERAÇÕES FINAIS | 67 |
| 4 REFERÊNCIAS GERAIS | 68 |

INTRODUÇÃO GERAL

Epilepsia é um dos mais comuns transtornos neurológicos, afetando cerca de 0,5 a 0,7% da população mundial (Kudin et al., 2009). Esta doença é definida como a condição de crises espontâneas e recorrentes. As manifestações clínicas são heterogêneas, variando de uma súbita interrupção da consciência e responsividade até convulsão do corpo inteiro (Stafstrom, 2006). Os fatores etiológicos da epilepsia variam desde insultos adquiridos até geneticamente determinados (Berg et al., 2010).

Um fato preocupante é que aproximadamente um terço dos pacientes portadores de epilepsia do lobo temporal são refratários ao tratamento medicamentoso disponível atualmente (Waldbaum e Patel, 2010). Nestes casos, precisa-se lançar mão de terapia não medicamentosa, como é o caso da dieta cetogênica (DC). Este tratamento dietético, que foi originalmente descrito como uma terapêutica para epilepsia humana em 1921, por Wilder (Vamecq et al., 2004), consiste de aproximadamente 80% da energia proveniente de lipídeos, em uma proporção média, com o restante dos demais macronutrientes, de 4:1 (lipídeos:carboidrato+proteína). Este alto aporte de calorias derivadas de lipídeos faz com que a produção de ATP seja prioritariamente a partir destes nutrientes, o que induz numerosas alterações no metabolismo de lipídeos, proteínas e carboidratos (Dahlin et al., 2006).

Existem dois tipos de DC: clássica, a qual é rica em triacilgliceróis de cadeia longa (TCL) e outra, desenvolvida mais recentemente, baseada em triacilgliceróis de cadeia média (TCM). Ambas produzem cetonemia e cetonúria em indivíduos e animais após o consumo (Liu et al., 2003).

A substituição dos TCL por TCM ganhou destaque no meio científico, no que se refere à busca de uma maior efetividade da dieta no controle das convulsões não responsivas a medicamentos e a procedimentos cirúrgicos. A proposição dessa classe de substâncias lipídicas, como um substrato energético alternativo para tratar tais condições, fundamenta-se em seu efeito na elevação dos corpos cetônicos, já considerado um mecanismo de ação da DC clássica; por apresentarem digestão e absorção mais rápidas que os TCL, em virtude de suas características químicas, promovem um aumento mais

rápido da cetonemia, podendo consistir em uma ferramenta terapêutica interessante (Calabrese et al., 1999; Yudkoff et al., 2003).

A presente dissertação, composta de dois artigos, trata dos efeitos da dieta cetogênica à base de trienantina, um TCM de propriedades terapêuticas promissoras, nos episódios convulsivos de ratos epiléticos. Pretende-se contribuir para a ampliação dos conhecimentos relativos aos benefícios da dieta cetogênica, já relatados amplamente pela literatura, através da investigação das possíveis propriedades anticonvulsivantes de uma fonte lipídica alternativa, de emprego relativamente recente na prática clínica, em transtornos hereditários de grave repercussão. Tem-se como perspectiva, a utilização da trienantina como ferramenta terapêutica eficaz e segura para pacientes epiléticos.

O primeiro artigo, *O papel da dieta cetogênica no estresse oxidativo presente na epilepsia*, apresenta uma revisão sobre a relação existente entre o estresse oxidativo e a epilepsia, destacando o possível efeito benéfico da dieta cetogênica neste contexto.

O segundo artigo intitula-se *Efeitos da dieta cetogênica à base de trienantina nos episódios convulsivos de ratos portadores de epilepsia induzida por pilocarpina*; trata-se de um estudo experimental, realizado em ratos *Wistar*, em que foram testadas, pelo período de 19 dias, duas dietas cetogênicas, uma à base de óleo de soja, nos moldes da dieta clássica, e outra à base de trienantina, como tratamento alternativo. O objetivo da pesquisa foi investigar os efeitos da DC à base de trienantina na frequência e duração das crises convulsivas de ratos tornados epiléticos, por meio do modelo de injeção intraperitoneal de pilocarpina.

Considerando-se a proposta do Programa de Mestrado em Nutrição da Universidade Federal de Alagoas, de submissão dos resultados obtidos no contexto do desenvolvimento da dissertação na forma de artigo a periódico especializado de destacada qualidade científica, os dois artigos foram formatados segundo as normas do *Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology*.

Como última sessão, são apresentadas as considerações finais, em que se pondera a necessidade de novas pesquisas com a finalidade de se expandir os resultados que aqui apareceram de forma modesta, porém promissora.

A DIETA CETOGÊNICA E O ESTRESSE OXIDATIVO PRESENTE NA EPILEPSIA

RESUMO

A epilepsia é um dos transtornos neurológicos mais comuns, sendo definida como uma condição de crises recorrentes espontâneas. Há uma importante relação entre radicais livres e enzimas antioxidantes no fenômeno epilético, e as espécies reativas de oxigênio (EROs) são implicadas na neurodegeneração induzida pelas crises. Terapia dietética é amplamente utilizada, como é o caso da dieta cetogênica. Esta dieta é rica em lipídeos e pobre em proteínas e carboidratos e é utilizada por mais de oito décadas para o tratamento de epilepsia refratária, principalmente em crianças. Sabe-se que esta dieta confere modulação da bionenergética mitocondrial, diminui a formação de espécies reativas de oxigênio, aumenta a capacidade antioxidante celular e ainda previne contra alterações do DNA mitocondrial. Evidências da atuação da dieta cetogênica na disfunção mitocondrial, como ocorre na epilepsia, são muitas e demonstram claramente efeitos benéficos dessa terapêutica.

Palavras chave: epilepsia refratária, dieta cetogênica, espécies reativas de oxigênio, disfunção mitocondrial.

ABSTRACT

Epilepsy is one of the most common neurological disorders, defined as a condition of spontaneous recurrent seizures. It has been found an important relationship between free radicals and antioxidant enzymes in epileptic phenomena and reactive oxygen species (ROS) have been implicated in

neurodegeneration induced by crises. Dietary therapy has been widely used, such as the ketogenic diet. The ketogenic diet is rich in fat and low in protein and carbohydrates and is used by more than eight decades for the treatment of refractory epilepsy, especially in children. We know that this diet provides modulation of mitochondrial bioenergetic, decreases the formation of reactive oxygen species, increases the antioxidant capacity and also prevents changes in mitochondrial DNA. Evidence of activity of the ketogenic diet on mitochondrial dysfunction, as occurs in epilepsy, are many and clearly demonstrate the beneficial effects of the therapy.

Keywords: refractory epilepsy, ketogenic diet, reactive oxygen species, mitochondrial dysfunction.

INTRODUÇÃO

A crise epiléptica pode ser definida de várias formas, mas a definição mais aceita na neurofisiologia é a de Hughlings Jackson, de 1870, que caracteriza tal crise como proveniente de uma descarga desordenada, excessiva e ocasional do tecido nervoso cerebral nos músculos (Ransom e Blumenfeld, 2007). A neurociência moderna tem demonstrado que as crises são o resultado de uma máxima atividade elétrica sincronizada e anormal em uma população de neurônios, região essa conhecida como foco epiléptico. Esse fenômeno inicial recruta rapidamente outras partes do cérebro, de modo que se tem uma divisão do insulto inicial, o qual apresenta uma descarga elétrica rítmica e auto-sustentada (Ransom e Blumenfeld, 2007).

Epilepsia, a condição de crises recorrentes, é um dos mais comuns transtornos neurológicos, afetando cerca de 0,5 a 0,7% da população mundial (Kudin et al., 2009). Esta doença ocorre de forma idiopática, como resultado de anormalidades congênitas no desenvolvimento cerebral, de alterações genéticas no metabolismo cerebral e na excitabilidade de neurônios e, ainda, a partir de insultos que lesam a anatomia e/ou fisiologia do cérebro normal (Berg et al., 2010).

Vários estudos sugerem que a disfunção mitocondrial pode ser um fator contribuinte na geração das crises epilépticas (Kunz et al., 2000; Nasseh et al., 2006; Waldbaum e Patel, 2010). A mitocôndria apresenta funções críticas que influenciam a excitabilidade neuronal, incluindo produção de trifosfato de adenosina (ATP), oxidação de ácidos graxos, controle de apoptose e de necrose, regulação do ciclo de aminoácidos, biossíntese de

neurotransmissores e regulação da homeostase do cálcio citosólico (Waldbaum e Patel 2010). É nesta organela que ocorre a produção primária das espécies reativas de oxigênio (EROs), tornando-a vulnerável ao dano oxidativo, o qual pode desempenhar um importante papel no controle da excitabilidade neuronal (Shin et al., 2008; Waldbaum e Patel 2010). Muitos estudos sugerem que as EROs, potentes fatores iniciadores do estresse oxidativo, têm sido implicadas no desenvolvimento de crises epiléticas (Santos et al., 2008; Freitas, 2009; Freitas e Tomé, 2010).

A peroxidação de lipídios de membrana, a qual acontece devido ao aumento da produção de EROs e/ou diminuição nos mecanismos de defesa, tem se tornado foco de estudo neste contexto, sendo apontada como responsável pelo desenvolvimento da injúria neuronal que acontece nos quadros de epilepsia (Freitas et al., 2005). O cérebro é um alvo preferencial para o processo peroxidativo, visto que é um órgão que apresenta um alto conteúdo em ácidos graxos poliinsaturados (Dal-Pizzol et al., 2000; Tomé et al. 2010). Em adição a isto, especialmente o hipocampo, possui baixos níveis de compostos antioxidantes, como, por exemplo, o alfa-tocoferol (Bellissimo et al., 2001; Freitas, 2009; Tomé et al., 2010). Um sistema de defesa antioxidante reduzido pode ser suficiente sob condições fisiológicas, porém, nos quadros de epilepsia, esse fato predispõe o cérebro ainda mais ao estresse oxidativo.

Terapias que visam minimizar o estresse oxidativo e, conseqüentemente, o dano neuronal são bastante utilizadas para diminuir os prejuízos causados pela epilepsia (Santos et al., 2008). Embora um progresso significativo foi alcançado no desenvolvimento de drogas antiepiléticas, aproximadamente um terço dos pacientes são refratários ao tratamento medicamentoso disponível

atualmente (Waldbaum e Patel, 2010). Nestes casos, precisa-se lançar mão de terapia não medicamentosa, como é o caso da dieta cetogênica (DC).

A DC é rica em lipídeos e apresenta um baixo conteúdo de proteínas e carboidratos, o que confere uma inversão da rota metabólica a partir da glicose para a geração e metabolismo de corpos cetônicos (Bough et al., 1999; Stafstrom, 1999; Waldbaum e Patel, 2010). Esta dieta melhora o status redox mitocondrial, estimula a biogênese mitocondrial em áreas cerebrais (Bough et al., 2006), promove a diminuição da produção de EROs devido ao estímulo da proteína desacopladora UCP2 (Sullivan et al., 2004), aumenta a capacidade antioxidante, além de prevenir contra mutações no DNA mitocondrial e morte celular (Yamamoto e Mohanan, 2003; Santra et al., 2004).

O presente trabalho, portanto, teve como objetivo investigar a relação existente entre o estresse oxidativo e a epilepsia, destacando o possível efeito benéfico da dieta cetogênica neste contexto, por meio de trabalho de revisão.

MÉTODO

Procedeu-se a pesquisa em artigos científicos publicados nos Bancos de Dados Medline, PubMed, Periódicos CAPES, ScienceDirect e Scielo. As palavras-chave selecionadas para a pesquisa incluíram epilepsia, *status epilepticus*, pilocarpina, estresse oxidativo, antioxidantes, convulsões, dieta cetogênica, epilepsia do lobo temporal, epilepsia experimental, canais iônicos, sistema nervoso central e hipocampo, no idioma correspondente ao do banco de dados consultado e agrupadas de maneiras diversas para otimizar a busca. Foram considerados estudos publicados nas línguas inglesa, espanhola e

portuguesa, compreendendo artigos de revisão, ensaios clínicos (estudos de coorte e caso-controle) e experimentais, que trataram da influência do estresse oxidativo sobre a epilepsia, bem como aqueles que abordaram o papel da dieta cetogênica neste contexto. Foram utilizados cerca de 100 artigos científicos com textos completos dentre os cerca de 300 que foram consultados.

O presente artigo foi elaborado na forma de revisão, em que o leitor vai encontrar inicialmente considerações acerca da epilepsia, conceitos, possíveis causas, classificação e modelos experimentais. Posteriormente, serão apresentadas informações sobre a ocorrência do estresse oxidativo no cérebro de epiléticos, trazendo um levantamento de resultados publicados na área. Para finalizar, mostra-se no último tópico a forma pela qual o uso da dieta cetogênica pode interferir no quadro de estresse oxidativo.

A EPILEPSIA

Desde a antiguidade a epilepsia causa espanto nas pessoas. As manifestações convulsivas e a perda de consciência, quase sempre, direcionavam as pessoas para uma explicação espiritual. Esse envolvimento da religião com a patologia é responsável pelo preconceito que os pacientes sofreram e ainda sofrem até os dias atuais (Gomes, 2006).

A epilepsia é um distúrbio da atividade cerebral caracterizada pela ocorrência periódica e espontânea da atividade elétrica altamente sincronizada, acompanhada de manifestações comportamentais (Berg et al., 2010). Ainda não existem estatísticas sobre a prevalência ou incidência de epilepsia na população brasileira na atualidade, entretanto a prevalência na cidade de Porto

Alegre é de 16 a 20 casos/1000 habitantes (Fernandes et al., 1992). A incidência global de epilepsia é cerca de 50 casos/100000 pessoas por ano em países desenvolvidos, já em países em desenvolvimento varia de 100-190 casos/100000 por ano (Bell e Sander, 2001). É oportuno destacar que parte dos pacientes epiléticos evolui para a epilepsia intratável do ponto de vista medicamentoso, tornando-se necessária a exploração de tratamentos alternativos, tais como uso da Dieta Cetogênica (DC) ou cirurgia, em casos mais extremos (Nonino-Borges et al., 2004; Guerreiro, 2008).

Segundo a *International League Against Epilepsy* (Berg et al., 2010), a epilepsia pode ser classificada de acordo com sua origem em genética, estrutural ou metabólica (adquirida) ou, ainda, de causa desconhecida. As epilepsias adquiridas são as mais comuns e ainda, dentro desta classificação, destaca-se a epilepsia do lobo temporal (ELT) (Ransom e Blumenfeld, 2007).

A ELT é a forma mais comum de epilepsia focal resistente ao tratamento farmacológico em adultos, representando pelo menos 30% de todos os casos (Babb, 1999). Este tipo de epilepsia é manifestado clinicamente por crises parciais complexas e, patologicamente, por esclerose mesial temporal, o que é caracterizado por atrofia hipocampal com perda de neurônios e gliose reativa (French et al., 1993; Mathern et al., 1995). Acredita-se que o desenvolvimento da ELT resulte de um insulto inicial ao cérebro que, tanto devido a sua severidade quanto a ocorrência em estágio precoce de desenvolvimento do órgão, leve a mudanças celulares e moleculares progressivas, favorecendo a hiperexcitabilidade e por fim desencadeando as crises (Mathern et al., 1995). Para que a ELT se manifeste em humanos, o insulto inicial ocorre, comumente, entre 1 e 5 anos de idade (Ransom e Blumenfeld, 2007).

Os tipos de insultos associados ao desenvolvimento de ELT incluem *Status Epilepticus* (SE), convulsões febris, trauma de cabeça e infecções no sistema nervoso central (Ransom e Blumenfeld, 2007). O SE é uma crise potencialmente letal, que dura mais de 30 minutos e pode resultar de distúrbios eletrolíticos ou metabólicos, trauma de cabeça, infecções do sistema nervoso central, etilismo, além de exposição a alguns venenos ou drogas como, por exemplo, a pilocarpina (Bealer et al., 2010). O SE se caracteriza por uma atividade límbica convulsiva, a qual pode ser detectada por eletroencefalograma e observada como repetidas crises motoras; pode levar a severos danos cerebrais, afetando principalmente o hipocampo, complexo amigdalóide, algumas regiões do tálamo e substância negra (Scorza et al., 2009).

Uma característica importante da ELT é a latência de meses a anos entre o insulto inicial e o desenvolvimento de crises espontâneas, o chamado período silencioso (Cavalheiro et al., 1991). É neste período, de quiescência relativa, que acontecem modificações deletérias na conectividade e organização celular, assim como na expressão de determinadas moléculas, fatores primordiais para a geração das crises espontâneas (Berg e Shinnar, 1997). Modelos clínicos e experimentais sugerem que “crise gera crise”, implicando um padrão contínuo de lesão e reforço dos processos adaptativos que produzem a condição epiléptica (Berg e Shinnar, 1997). Dessa forma a ELT pode ser vista como uma doença adquirida, resultante de vários insultos, tendo seu desenvolvimento dependente do tempo, além de sofrer também influências da genética.

Muitas informações de que a ciência dispõe atualmente sobre a base celular e molecular da epileptogênese foram obtidas a partir de modelos

animais. Segundo White (2002), um modelo animal apropriado de epileptogênese tem as mesmas características da epilepsia humana, um período latente seguido do insulto inicial, hiperexcitabilidade crônica e crises espontâneas. Manipulações que produzem SE em animais experimentais têm mostrado satisfazer a estes critérios (White, 2002).

Dentre os modelos onde se pode observar a ocorrência de SE estão a injeção intraperitoneal ou intra-hipocampal de pilocarpina ou ácido caínico (Cavalheiro et al., 1991; Furtado et al., 2002), estimulação elétrica do hipocampo ventral (Lothman et al., 1989; Bertram e Corneth, 1993), estimulação da via perforante (Shirasaka e Wasterlain, 1994), e a estimulação elétrica da amígdala (Nissinen et al., 2000).

O modelo da pilocarpina (PILO) tem sido amplamente utilizado em função da facilidade técnica e, principalmente, pela semelhança fisiopatológica com a epilepsia do lobo temporal humana. Essa droga é um potente agonista muscarínico que promove, em ratos, uma sequência de alterações comportamentais e eletroencefalográficas que resulta no desenvolvimento da epilepsia (Scorza et al., 2009).

A administração sistêmica de PILO, método mais utilizado pelos pesquisadores da área, promove mudanças eletroencefalográficas e comportamentais que podem ser divididas em três períodos distintos: (a) um período agudo que evolui progressivamente para SE límbico e que dura 24 horas, (b) um período silencioso com uma normalização progressiva do eletroencefalograma (EEG) e do comportamento, o qual varia de 4-44 dias, e, (c) um período crônico com crises recorrentes espontâneas (CRE) (Cavalheiro, 1995). O modelo da PILO pode ser associado a crises do despertar, pois a

maioria das crises ocorre após um período de sono do animal (Leite et al., 1990).

Diferentes autores têm demonstrado que crises de longa duração, como o SE, desencadeiam uma complexa cascata química, acionando alterações neuroquímicas nos neurônios e células da glia (Naffah-Mazzacoratti et al., 1995; Scorza et al., 2009). Esses eventos imediatos ou de longa duração podem modificar o meio celular através de mudanças no gradiente iônico em volta da membrana celular, alteração na expressão gênica de moléculas como receptores, fatores tróficos, enzimas, proteínas do citoesqueleto, proteínas da matriz, além de alterar a fosforilação de macromoléculas (Ransom e Blumenfeld, 2007). Essas modificações promovem remodelamento sináptico, o qual pode alterar a excitabilidade de neurônios de estruturas temporais, levando ao dano cerebral e um estado de hiperexcitabilidade permanente (Mello et al., 1993; Scorza et al., 2009).

O hipocampo de ratos submetidos ao modelo de epilepsia induzida por PILO mostra aumentada taxa de utilização de norepinefrina (NE) e diminuída utilização de dopamina durante os períodos agudo, silencioso e crônico desse modelo (Scorza et al., 2009). Enquanto que a taxa de utilização da serotonina foi aumentada apenas no período agudo da doença (Cavalheiro, 1994). Em relação aos aminoácidos neurotransmissores, a fase aguda da doença foi caracterizada por uma aumentada liberação de glutamato no hipocampo (Costa et al., 2004). Quando glutamato ativa receptores N-Metil-D-Aspartato (NMDA), o cálcio intracelular (Ca^{++}) se eleva induzindo ativação de lipases, proteases e nucleases, matando a célula por necrose ou apoptose (Scorza et al., 2009). De acordo com Funke e colaboradores (2003), no hipocampo de ratos, submetidos

ao modelo pilocarpina de epilepsia, a expressão de SERCA2b e PMCA, ATPases envolvidas na restauração do nível normal de Ca^{2+} dentro da célula, está aumentada 1 hora após o SE, mostrando o esforço para controlar a excitabilidade da célula durante os estágios iniciais do insulto.

A fase silenciosa do modelo pilocarpina de epilepsia, período de intensa epileptogênese, é marcada por um importante desequilíbrio entre inibição e excitação (Cavalheiro et al., 1994; Ransom e Blumenfeld, 2007). Mudanças nos circuitos hipocámpais é um dos motivos pelos quais o balanço excitação/inibição é trocado na epilepsia do lobo temporal. Alterações na liberação, na remoção e expressão dos receptores de neurotransmissores são responsáveis por alterar este equilíbrio (Ransom e Blumenfeld, 2007). Os transportadores de glutamato, aminoácido que ativa a neurotransmissão excitatória via receptores NMDA, AMPA e de cainato, nos neurônios e nas células da glia desempenham importante papel na manutenção dos níveis apropriados de glutamato e eventos sinápticos, prevenindo assim a injúria excitotóxica. Sob condições eletricamente desfavoráveis, esses transportadores podem agir no sentido inverso e tornarem-se fonte de glutamato, fato este que pode resultar em efeitos deletérios para o sistema nervoso central, incluindo aparecimento de crises epiléticas (Campbell e Hablitz, 2004; 2005).

A epilepsia do lobo temporal tem sido relacionada à excitabilidade excessiva nas estruturas límbicas ou a baixa atuação dos caminhos inibitórios (neurônios GABAérgicos) ou ainda, a associação entre ambos os eventos (Bough e Rho, 2007). Como uma consequência da neurotransmissão alterada, a transdução do sinal através da membrana plasmática é também modificada,

mudando o metabolismo neuronal e a expressão gênica (Scorza et al., 2009). Como um efeito compensatório, fatores de crescimento podem ser liberados e a ativação de seus receptores induz a autofosforilação dessas moléculas e a ativação de diferentes cinases de proteínas, incluindo a fosforilação em resíduos de tirosina, a qual é importante no ciclo celular e nos mecanismos de sinalização intracelular. Essas proteínas fosfotirosinas (PTyP) estão aumentadas no hipocampo de ratos durante os estágios iniciais do SE induzido por PILO (Funke et al., 1998), mostrando que vários eventos intracelulares podem sofrer modificações durante as crises de longa duração, principalmente na região conhecida como CA3 do hipocampo.

Durante as crises de longa duração, a ativação de processos inflamatórios pode também ocorrer. A microglia ativada tem sido considerada principal fonte de citocinas inflamatórias (Binder and Steinhäuser, 2006). Vários autores descrevem aumentada expressão de RNAm para algumas interleucinas como, IL-1 β , IL-6 e TNF- α (Fator de Necrose Tumoral), além de iNOS (sintase de óxido nítrico induzida). Caminhos inflamatórios específicos são cronicamente ativados durante a epileptogênese e eles persistem na epilepsia crônica, sugerindo que podem contribuir de forma importante para a etiologia da epilepsia do lobo temporal (Ravizza et al., 2008).

Outro caminho envolvido nesses processos inflamatórios é a liberação de prostaglandinas (PG) (Scorza et al., 2009). Esses eicosanóides são produzidos após a ação da fosfolipase A2 nos fosfolipídios de membrana, havendo a liberação do ácido araquidônico (AA), porém, esta liberação pode também ser feita pela ação do glutamato nos receptores NMDA. Algumas PGs mostram-se aumentadas nos tecidos de animais nos quais a epilepsia foi induzida por

PILO; $\text{PGF}_2\alpha$ está aumentada apenas no período agudo da doença, enquanto PGD_2 está elevada nos três períodos da doença, e a PGE_2 encontra-se acima do normal apenas no período crônico (Naffah-Mazzacoratti et al., 1995).

Durante a formação das PGs, espécies reativas de oxigênio (EROs) são produzidas, contribuindo ainda mais para o processo inflamatório. Essas espécies são também liberadas durante o metabolismo da glicose e na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial (Naffah-Mazzacoratti et al., 1995), mecanismos esses que são super ativados no SE. Somado a isto, a superóxido dismutase (SOD), enzima que faz parte da defesa antioxidante endógena, a qual é responsável pela dismutação do ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), apresentou uma atividade diminuída durante as crises, associada a um nível aumentado de hidroperóxido no hipocampo de animais epiléticos, mostrando dano tissular e peroxidação lipídica (Bellissimo et al., 2001).

Os estudos experimentais sugerem que o estresse oxidativo é um fator contribuinte importante para a instalação e evolução da epilepsia, devendo sempre ser levado em consideração na fisiopatologia dessa doença. Conhecimentos acerca desta temática precisam ser progressivamente adquiridos, com a finalidade de se encontrar terapêuticas para combatê-lo.

O ESTRESSE OXIDATIVO NA EPILEPSIA

O cérebro representa cerca de 2% do peso do corpo total, mas consome aproximadamente 20% do total de oxigênio em um humano adulto (Clark e Sokoloff, 1999). Mais da metade da energia cerebral é utilizada pela Na^+/K^+ ATPase, a fim de restaurar o potencial de repouso das células excitatórias

(Ames, 2000). Para alcançar essa grande quantidade de energia, o sistema nervoso central (SNC) contém uma enorme quantidade de mitocôndrias. Como este sistema é altamente dependente da produção de energia mitocondrial, torna-se vulnerável à disfunção desta organela (Patel, 2004).

Um tipo de disfunção mitocondrial amplamente estudado que pode causar doenças é a produção excessiva e o acúmulo de espécies reativas de oxigênio dentro da célula (Waldbaum e Patel, 2010). Espécies reativas de oxigênio (EROs), assim como as espécies reativas de nitrogênio (ERNs), são bioprodutos do metabolismo do oxigênio e do nitrogênio altamente reativos. Essas espécies não estão apenas relacionadas a mudanças nocivas na célula, mas também modulam caminhos fisiológicos. Entretanto, quando são produzidas em excesso, ou ainda quando os mecanismos responsáveis por processar/eliminar essas espécies são insuficientes, instala-se o Estresse Oxidativo (Patel, 2002).

Durante a fosforilação oxidativa, evento mitocondrial no qual há a formação de ATP a partir de ADP e Pi, a transferência de elétrons que acontece permite o vazamento de alguns destes, o que então resulta na produção de EROs, como ânions superóxidos ($O_2^{\cdot-}$) (Raha e Robinson, 2000; Balaban et al., 2005). Dentro dos neurônios, existe uma alta taxa de fosforilação oxidativa e utilização de oxigênio, o que resulta em aumentada taxa de formação de bioprodutos superóxidos.

A cadeia transportadora de elétrons mitocondrial é crítica para processos de fosforilação, regulação da permeabilidade da membrana, biossíntese de neurotransmissores, excitação e é fonte primária de ATP celular envolvido na manutenção das bombas iônicas, como a Na^+/K^+ ATPase, o que contribui para

a excitabilidade neuronal (Waldbaum e Patel, 2010). Quando as enzimas dessa cadeia não funcionam adequadamente, como ocorre na epilepsia do lobo temporal, os níveis de EROs mitocondriais aumentam resultando em dano oxidativo (Bandy e Davison, 1990). A função da cadeia transportadora de elétrons danificada, como resultado da ação de EROs, pode levar à despolarização dependente de Ca^{2+} do potencial de membrana mitocondrial, resultando em consumo de oxigênio incompleto, reduzida produção de ATP e super produção de EROs (Patel, 2004; Liang et al., 2000).

O movimento do cálcio dentro dos neurônios tem mostrado ser crítico para a função normal da célula e a mudança no fluxo desse cátion pode resultar em uma situação de estresse oxidativo, devido à aumentada atividade da sintase de óxido nítrico ou a uma depressão na função da cadeia respiratória (Kann e Kovács, 2007). Também, existem muitos neurotransmissores, como a dopamina e a norepinefrina, os quais podem se auto-oxidar formando quininas reativas, que podem ser nocivas (Scorza et al., 2009). Adicionalmente, áreas dopaminérgicas do cérebro geram peróxido de hidrogênio (H_2O_2) como um bioproduto da quebra da dopamina por monoamina oxidase B (MAO-B) (Murata, 2004). Essa situação pode ser exacerbada pelo fato de que a atividade da catalase (CAT), enzima que processa o H_2O_2 no hipocampo, é diminuída no cérebro, sobrecarregando a atividade da glutathione (GSH) e glutathione peroxidase (GPx), para remover o perigoso H_2O_2 presente nas células.

Como citado anteriormente, o cérebro possui uma alta quantidade de ácidos graxos poliinsaturados, o que o torna mais vulnerável aos processos de peroxidação lipídica. Contribuindo de forma importante com todo este cenário,

têm-se os altos níveis de ferro no cérebro e a baixa capacidade de ligação desse íon no fluido cérebro-espinhal, o que rende aos neurônios mais suscetibilidade ao dano oxidativo. Assim, a liberação de ferro após alguma injúria ao SNC pode contribuir para um aumento na degradação de H_2O_2 , catalisada pelo mineral, e o conseqüente dano oxidativo (Rismanchi e Blackstone, 2007).

No SNC, a superprodução de espécies reativas de oxigênio pode ainda ser secundária ao fenômeno denominado excitotoxicidade, o qual é definido como a excessiva liberação de glutamato que pode induzir aumento intracelular nas concentrações de cálcio, modificando a homeostase desse íon e matando neurônios (Cavalheiro et al., 1994). A epilepsia do lobo temporal tem sido fortemente associada a este fenômeno (Bellissimo et al., 2001). Como referido por alguns autores, a excitotoxicidade do glutamato acontece devido a uma ativação excessiva dos receptores desse aminoácido (Rothman e Olney, 1987; MacDonald et al., 1989). Perda neuronal associada às crises pode diminuir transportadores gliais de glutamato, o que pode aumentar os níveis de glutamato extracelular e levar a adicional morte dos neurônios, resultando em um perfil cíclico (Bellissimo et al., 2001; Waldbaum e Patel, 2010).

O glutamato extracelular é normalmente captado por meio de transportadores de glutamato astrogliais e rapidamente convertido em um aminoácido não excitotóxico, a glutamina, pela ação da glutamina sintetase (GS). A glutamina é transportada de volta para os neurônios, onde é reconvertida em glutamato, em um processo denominado ciclo do glutamato/glutamina (Eisenberg et al., 2000). Em um modelo animal de deficiência de GS hipocampal, a maioria dos ratos apresentou crises

recorrentes e espontâneas e um grupo exibiu fatos neuropatológicos similares aos dos pacientes com epilepsia do lobo temporal, sugerindo que deficiência desta enzima no hipocampo causa crises recorrentes. Sabe-se que esta enzima é oxidada sob condições de estresse oxidativo, ou seja, sua atividade é sensível às EROs e ERNs (Eid et al., 2008).

Um mês após SE induzido por pilocarpina, a disfunção mitocondrial é evidente, pois, há uma diminuição na atividade dos complexos I e IV da cadeia transportadora de elétrons, assim como uma queda no potencial de membrana mitocondrial medido em regiões CA1 e CA3 do hipocampo (Kudin et al., 2002). Segundo o autor, essas anormalidades aconteceram devido ao estresse oxidativo crônico que diminuiu o número de cópias do DNA mitocondrial resultando em uma baixa regulação das enzimas da cadeia transportadora de elétrons que eles codificam. Acúmulo de lesões oxidativas no DNA mitocondrial confere ao cérebro mais vulnerabilidade às subseqüentes crises epiléticas (Kudin et al., 2002). Somando-se a isto, dano estrutural à mitocôndria tem sido observado no hipocampo de ratos tratados com algum agente químico indutor de crises epiléticas (Chuang et al., 2004). A ligação entre disfunção mitocondrial e epilepsia sustenta-se pelas evidências nas quais certos pacientes com epilepsia do lobo temporal apresentam deficiência na atividade do complexo I da cadeia transportadora de elétrons no foco da crise (Kunz et al., 2000).

Proteínas expostas às EROs exibem alteradas estruturas primárias, secundárias e terciárias, sofrem fragmentação espontânea e apresentam aumentada susceptibilidade proteolítica (Waldbaum e Patel, 2010). SE induzido por pilocarpina reduziu as enzimas aconitase, enzima do ciclo do ácido

tricarboxílico que contém ferro em seu centro ferro-enxofre (Fe-S), que é vulnerável ao dano oxidativo por $O_2^{\cdot-}$ e espécies relacionadas, e alfa-cetoglutarato desidrogenase, dentro de 16-44 horas após o SE (Cock et al., 2002). Uma consequência da inativação oxidativa da aconitase é a liberação de ferro e geração de H_2O_2 , o que pode formar radical hidroxil (OH^{\cdot}) e assim, resultar em adicional dano oxidativo (Waldbaum e Patel, 2010).

De acordo com Naffah-Mazzacoratti e colaboradores (1995), no hipocampo de ratos tratados com pilocarpina, foram encontrados aumentados níveis de prostaglandinas (PGE_2 , PGD_2 e $PGF_{2\alpha}$), nos períodos agudo, silencioso e crônico da epilepsia. Esse é um dado de bastante importância, visto que, o aumento na produção desses compostos resulta em consequente aumento na formação de superóxido e hidroperóxidos (Scorza et al., 2009). Juntos, esses dados sugerem que o hipocampo dos animais tratados com pilocarpina, para induzir epilepsia, é vulnerável ao estresse oxidativo nos três períodos da doença.

Bellissimo e colaboradores (2001), estudando o modelo de epilepsia induzido por pilocarpina, encontraram, no hipocampo, 24 horas após o SE, uma diminuição na atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), enzima responsável por metabolizar o $O_2^{\cdot-}$ a oxigênio molecular e H_2O_2 . Em adição a este dado, no mesmo estudo, os autores encontraram elevados níveis de hidroperóxido (HPx), o que pode indicar que a peroxidação lipídica pode ser dependente da diminuição da atividade da SOD. Segundo Waldbaum e Patel (2010), a peroxidação lipídica que resulta da disfunção mitocondrial pode comprometer a capacidade das células em manter os níveis de energia, acionando desta forma eventos que levam à injúria e morte neuronal.

Além de defesas antioxidantes enzimáticas, a exemplo da SOD, já mencionada, e da catalase após as crises epilépticas, existem outros mecanismos responsáveis pela defesa antioxidante endógena, como por exemplo a glutatona (GSH), que é a principal responsável pela defesa antioxidante intracelular não enzimática no corpo. Após oxidada, a glutatona (GSSG) é reciclada pela glutatona redutase, com oxidação simultânea de NADPH. A razão GSH/GSSG é comumente utilizada como biomarcador de estresse oxidativo em sistemas biológicos (Reed e Savage, 1995). Quando essa razão encontra-se diminuída pode induzir dano estrutural à membrana mitocondrial, mudanças nas atividades de enzimas da mitocôndria, alteração do potencial de membrana e consequente disfunção mitocondrial, afetando a excitabilidade neuronal (Liang e Patel, 2006).

De acordo com Freitas e colaboradores (2005), 24 horas após o SE induzido por pilocarpina, a CAT, mas não a SOD, encontrava-se reduzida no hipocampo, sugerindo que esta região do cérebro não utiliza a SOD como maior sistema de limpeza contra EROs, mas sim CAT e/ou GSH. Em outro estudo, no qual os animais foram submetidos à injeção de ácido caínico, foi percebido um aumento nos níveis de F₂-isoprostanos (F₂-IsoP) e posterior morte neuronal extensiva na região CA3 do hipocampo (Patel et al., 2004), sugerindo que um estado redox alterado pode contribuir para a morte neuronal induzida por crises epilépticas, como citado anteriormente.

Atualmente, vasta atenção tem sido dada ao consumo de antioxidantes e seu papel na redução das taxas de doenças crônicas como epilepsia, câncer, doenças cardiovasculares, diabetes, entre outras (Carr e Frei, 1999). A certas substâncias antioxidantes, como as vitaminas E (α -tocoferol) e C e os

carotenóides, têm sido atribuídos efeitos benéficos, pela inibição da peroxidação lipídica e do dano oxidativo celular (Xavier et al., 2007).

Tomé e colaboradores (2010), ao administrarem α -tocoferol a ratos, antes da injeção de pilocarpina, obtiveram como resultado a diminuição do nível de peroxidação lipídica e o conteúdo de nitrito, bem como o aumento das atividades das enzimas SOD e CAT. Crises induzidas por pilocarpina levam a mudanças no metabolismo de óxido nítrico e aumentada produção de seus metabólitos (nitrito e nitrato). Esses metabólitos, quando aumentados, podem interagir com receptores glutamatérgicos e produzir ações estimulatórias no SNC (Michiels et al., 1994).

Santos e colaboradores (2008) estudaram os efeitos neuroprotetores da vitamina C em ratos adultos, após crises induzidas por pilocarpina, e verificaram que o pré-tratamento com vitamina C, antes da injeção de pilocarpina, aumentou a latência para a primeira crise e reduziu a taxa de mortalidade após as crises induzidas por esta droga. Neste mesmo grupo, também perceberam que esta vitamina diminuiu os níveis de peroxidação lipídica, pois, esses animais mostraram níveis de malonaldeído (MDA) menores que os animais do grupo controle. Uma variedade de métodos para análise de peroxidação lipídica é utilizada, entretanto, o uso *in vivo* está associado com problemas como a instabilidade do produto final, falta de sensibilidade e especificidade inadequada para processos mediados por radicais livres. Por exemplo, o método TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) não é específico para peroxidação lipídica e o uso do MDA como um indicador para este evento pode ser problemático devido às etapas de homogeneização e extração dos solventes orgânicos (Cohen et al., 1987), mesmo assim esse

método ainda é amplamente utilizado. Por outro lado, F(2)-isoprostanos (F₂-IsoPs) são considerados melhores marcadores de peroxidação lipídica *in vivo*, porque são produtos específicos dessa reação, detectados em fluidos biológicos normais, e elevam-se dramaticamente em modelos de injúria oxidativa, além de serem modulados pelo *status* antioxidante e não sofrerem influência de lipídios dietéticos. Estes compostos são semelhantes à prostaglandina F₂ (PGF₂), porém, são produzidos por reação catalisada por radicais livres e estão envolvidos na peroxidação lipídica do ácido araquidônico (Roberts e Morrow, 2000).

Diante deste cenário, percebe-se que o estresse oxidativo está intimamente relacionado às mudanças neuroquímicas observadas durante o SE e as crises recorrentes espontâneas da epilepsia do lobo temporal, especialmente, as induzidas por pilocarpina e ácido caínico, que foram aqui especialmente citadas. O desenvolvimento das crises é acompanhado por uma formação aumentada de espécies reativas de oxigênio no hipocampo, o que é um fator patogênico importante para a morte celular induzida pelas crises. Dessa forma, a busca por terapias que possam inibir a disfunção mitocondrial e, conseqüentemente, o estresse oxidativo torna-se necessária. Terapias antioxidantes, como o uso de vitaminas C e E, assim como os carotenóides e outras substâncias como ácido lipóico, melatonina, além das terapias sintéticas, com o uso de enzimas como SOD e CAT, a fim de diminuir os efeitos deletérios do SE, pode ser uma alternativa interessante para o controle da epilepsia. Terapia não farmacológica também tem sido amplamente utilizada, como é o caso da dieta cetogênica, a qual tem conferido

neuroproteção por meio da redução da injúria oxidativa e da morte neuronal, além de manter os processos bioenergéticos e preservar a função celular.

DIETA CETOGÊNICA E ESTRESSE OXIDATIVO

No passado, diversas curas dietéticas para a epilepsia foram propostas, e dessa forma, a limitação ou o consumo em excesso de alguma substância alimentar era prescrita como medida terapêutica. Na época de Hipócrates, o jejum foi indicado como conduta para curar a epilepsia. No quinto século antes de Cristo, Hipócrates relatou a história de um homem que apresentou convulsões epiléticas após ter tomado um banho quente no inverno. Na ocasião, abstinência completa de alimentos e bebidas foi prescrita e dessa forma o homem ficou curado (Wheless, 2004). Na Bíblia, Jesus cura um garoto epilético e explica que a cura só pode ser obtida pela prática da oração e do jejum (Wheless, 2004).

Anos mais tarde, como citado por Kossoff e Freeman (2004), o médico Wilder, certamente baseado nos diversos trabalhos anteriores, propôs que os benefícios do jejum eram obtidos por meio da cetonemia, a qual poderia ser promovida por meio de outras formas além da falta de ingestão alimentar. Ele completou ainda que os corpos cetônicos eram formados a partir do metabolismo de gorduras, quando havia um desequilíbrio entre a ingestão de gorduras e carboidratos. Wilder sugeriu que a dieta cetogênica era tão efetiva quanto o jejum e poderia ser mantida por um período mais longo, compensando desta forma a desvantagem óbvia de um jejum prolongado.

Ao longo dos anos 20 e 30, a dieta cetogênica foi amplamente prescrita para pacientes epiléticos. Posteriormente, esse tratamento foi ocultado pelo aparecimento de drogas antiepiléticas na prática clínica. Uma nova era na terapia para a epilepsia estava começando e a dieta cetogênica ficou esquecida (Vamecq et al., 2005).

O uso dessa dieta como tratamento para epilepsia foi diminuindo gradativamente. Em outubro de 1994, a dieta cetogênica voltou a receber atenção quando uma rede de televisão americana mostrou a história de Charles, um garoto com dois anos de idade que apresentava crises tônico-clônicas, tônica generalizada e mioclônica intratável. O pai de Charles, pesquisando por conta própria tratamentos para epilepsia, encontrou uma referência sobre a dieta cetogênica. Charles iniciou o tratamento com a dieta, ficou livre das crises e logo apresentou progresso em seu desenvolvimento (Freeman et al., 1990).

A dieta cetogênica tem ressurgido como forma de tratamento para pacientes epiléticos nos últimos anos e estudos clínicos modernos têm atestado sua eficácia significativa, especialmente porque alguns pacientes não responderam à terapia medicamentosa e foi necessário utilizar-se de medidas alternativas no tratamento. Dessa forma, a dieta cetogênica voltou a ser utilizada como terapia para pacientes epiléticos, porém, agora dirigida àqueles que são resistentes à ação de fármacos (Vamecq et al., 2005).

Em um esforço para fazer a dieta cetogênica mais palatável, Huttenlocher e colaboradores, em 1971, introduziram triacilglicerol de cadeia média (TCM) na composição da dieta, permitindo uma menor restrição dos outros alimentos, visto que o TCM é mais cetogênico por caloria. Esse trabalho documentou a

eficácia terapêutica dessa dieta em seis das 12 crianças epilêpticas tratadas. Outros centros de tratamento adotaram a dieta com TCM em detrimento a dieta cetogênica clássica, constituída basicamente por triacilgliceróis de cadeia longa (TCL). Porém, 20 anos após, um teste comparativo entre os dois tipos de dietas cetogênicas, a clássica e a com TCM, concluiu que a última apresentava mais efeitos colaterais e menor palatabilidade (Schwartz et al., 1989).

A dieta cetogênica é uma dieta hiperlipídica, pobre em carboidrato e proteína, fornecendo aproximadamente 80% da energia proveniente de lipídeos, em uma proporção média, com o restante dos demais macronutrientes, de 4:1 (lipídeos:carboidrato+proteína) (Bough et al., 1999). Este alto aporte de calorias derivadas de lipídeos faz com que a produção de ATP seja prioritariamente a partir destes nutrientes. Isso induz numerosas alterações no metabolismo dos macronutrientes (Dahlin et al., 2006), sendo a principal alteração o desvio do metabolismo da glicose para a geração e metabolismo de corpos cetônicos. Ratos alimentados com essa dieta apresentam cetonemia, a qual é necessária para os efeitos anticonvulsivantes da dieta (Bough et al., 1999; Stafstrom, 1999).

Atualmente, os pesquisadores ainda desconhecem o mecanismo de ação pelo qual a dieta cetogênica atua. As duas teorias mais aceitas incluem a neuroproteção dos corpos cetônicos (β -hidroxibutirato, acetoacetato e acetona) (Massieu et al., 2003; Noh et al., 2006; Kim et al., 2007) e os efeitos anticonvulsivantes da inibição da glicólise (Schwechter et al., 2002). A modulação da bioenergética mitocondrial pela dieta cetogênica tem sido sugerida também como responsável pelos efeitos protetores desta dieta. Estudos atestaram que a dieta produz biogênese mitocondrial (Bough et al.,

2006), diminui a formação de espécies reativas de oxigênio (Maalouf et al., 2007) devido a super-regulação da proteína desacopladora UCP2 (Sullivan et al., 2004), aumenta a capacidade antioxidante celular (Ziegler et al., 2003; Costello e Delanty, 2004; Nazarewicz et al., 2007) e, ainda, os estudos *in vitro* têm demonstrado que bioprodutos da cetose podem prevenir alterações no DNA mitocondrial, assim como também previnem a morte celular (Yamamoto e Mohanan, 2003).

Bough e colaboradores (2006) propuseram que a cetose crônica ativa o programa genético que leva à biogênese mitocondrial no hipocampo, a qual resulta em aumentados estoques energéticos. Esses autores afirmam que esse fenômeno aumenta a capacidade de produção de ATP, com excesso de fosfato de alta energia estocado na forma de fosfocreatina. Ainda segundo esses autores, glutamato e glutamina, formados a partir do ciclo do ácido cítrico estimulado por cetonas, fornecem um importante estoque de energia secundário, o qual juntamente à fosfocreatina podem manter os níveis de ATP quando houver necessidade, como por exemplo, durante a hiperexcitabilidade neuronal que leva às crises. Isso resulta em uma estabilização do potencial de membrana, o que por sua vez aumenta a resistência ao insulto causador de crises (Bough et al., 2006).

Maloouf e colaboradores (2007) afirmaram que as cetonas, as quais são produzidas a partir do jejum, da dieta cetogênica ou de restrição calórica, preveniram a excitotoxicidade do glutamato por meio da redução dos níveis de EROs, tanto em neurônios neocorticais dissociados, quanto em mitocôndria neocortical dissociada. Eles demonstraram adicionalmente, que essa redução ocorre devido ao aumento da oxidação de NADH, ou seja, um aumento na taxa

NAD⁺/NADH, e também devido ao aumento na respiração mitocondrial nesses neurônios. Dessa forma, os autores enfatizam as propriedades neuroprotetoras das cetonas, estabelecendo sua atividade antioxidante em nível mitocondrial.

Outro experimento realizado com dieta cetogênica demonstrou que esse tratamento dietético estimulou a atividade da proteína desacopladora mitocondrial (UCP2), no hipocampo, e diminuiu a produção de EROs (Sullivan et al., 2004). Vale ressaltar que essa diminuição é devida à redução do desvio de elétrons da cadeia respiratória. Diante disso, pode-se inferir que a dieta cetogênica pode reduzir indiretamente o estresse oxidativo e, portanto, exercer um efeito neuroprotetor. As UCPs mitocondriais possuem várias funções, todas relacionadas ao seu papel primário na diminuição do gradiente de prótons em volta da membrana mitocondrial interna. O resultado dessa ação é a diminuição da síntese de ATP, assim como no influxo de cálcio na matriz mitocondrial, o que minimiza a produção de EROs (Sullivan et al., 2004).

Outra evidência do papel importante que a dieta cetogênica apresenta no combate ao estresse oxidativo foi relatada por Ziegler e colaboradores (2003). Esses autores afirmam que a dieta é protetora contra transtornos epiléticos porque afeta a atividade antioxidante, particularmente a glutathione peroxidase (GPx). Eles encontraram, em um modelo experimental de epilepsia, induzida por pilocarpina, um aumento da GPx no hipocampo durante a primeira hora do *Status Epilepticus*. Dessa forma, pode-se dizer que uma alta atividade da GPx induzida pela dieta cetogênica, pode contribuir para proteger o hipocampo das seqüelas degenerativas dos transtornos epiléticos.

Nazarewicz e colaboradores (2007) mostraram que o tratamento com dieta cetogênica por 14 dias aumentou a capacidade antioxidante no sangue

de sujeitos saudáveis. Esse trabalho demonstrou um aumento significativo na capacidade antioxidante total e nos níveis de ácido úrico no plasma de pessoas saudáveis após os 14 dias de tratamento dietético. Deve-se ressaltar que ácido úrico funciona como varredor de EROs, protegendo dessa forma contra o estresse oxidativo (Adachi et al., 2004).

Demonstrou-se, recentemente, que a dieta cetogênica eleva a capacidade redox em ratos alimentados por três semanas, o que melhora a habilidade do cérebro para resistir a mudanças metabólicas e ao estresse oxidativo, sendo este último parcialmente envolvido na ocorrência de crises. Ainda nesse estudo, foi demonstrado um aumento nos níveis de GSH e estímulo a sua biossíntese endógena, além da melhora do nível redox mitocondrial, resultando em diminuída produção mitocondrial de EROs e proteção ao DNA mitocondrial. (Jarret et al., 2008).

Atualmente, ainda não há consenso da comunidade científica acerca dos mecanismos que contribuem para os efeitos anticonvulsivantes da DC. Porém, várias evidências demonstram que o mecanismo de ação da DC pode ser devido ao bloqueio ou ainda, a diminuição dos processos oxidativos na célula. Investigações adicionais são necessárias a fim de fornecer maior entendimento acerca desta temática.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Essa revisão relaciona a influência do uso da dieta cetogênica e o controle do quadro de estresse oxidativo cerebral, que acontece na epilepsia. Embora a dieta tenha seu efeito antiepiléptico comprovado há mais de 80 anos, não existe ainda um consenso de quais mecanismos de ação são responsáveis por esse achado. Muitos trabalhos científicos afirmam que a dieta cetogênica tem ação antiepiléptica devido ao seu papel na mitocôndria. Nesse cenário, as evidências da atuação da dieta cetogênica na disfunção mitocondrial, como ocorre na epilepsia, são muitas e demonstram claramente efeitos benéficos dessa terapêutica.

Estudos posteriores tornam-se necessários, a fim de melhor compreender os mecanismos subjacentes ao desenvolvimento da epilepsia, de modo a permitir um melhor planejamento terapêutico, o que maximizaria a eficácia e minimizaria os efeitos colaterais de tratamentos como a dieta cetogênica.

REFERÊNCIAS

1. Adachi T, Weisbrod RM, Pimentel DR, Ying J, Sharov VS, Schöneich C, Cohen RA. S-Glutathiolation by peroxynitrite activates SERCA during arterial relaxation by nitric oxide. *Nat Med.* 2004;10(11):1200-1207.
2. Ames AI. CNS energy metabolism as related to function. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 2000;34, 42–68.
3. Babb TL. Synaptic reorganizations in human and rat hippocampal epilepsy. *Adv Neurol* 1999; 79: 763–779.
4. Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 2005; 120: 483–495.

5. Bandy B, Davison AJ. Mitochondrial mutations may increase oxidative stress: implications for carcinogenesis and aging? *Free Radic. Biol. Med.* 1990;8(6):523-539.
6. Bealer SL, Little JG, Metcalf CS, Brewster AL, Anderson AE. Autonomic and cellular mechanisms mediating detrimental cardiac effects of status epilepticus. *Epilepsy Res* 2010; 91:66-73.
7. Bell GS, Sander JW. CPD Education and self-assessment The epidemiology of epilepsy: the size of the problem. *Seizure* 2001; 10: 306–316.
8. Bellissimo MI, Amado D, Abdala DSP, Ferreira ECF, Cavalheiro EA, Naffah-Mazzacoratti. Superoxide dismutase, glutathione peroxidase activities and the hydroperoxide concentration are modified in the hippocampus of epileptic rats. *Epilepsy Res* 2001; 46: 121–128.
9. Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ, Buchhalter J, Cross JH, Boas WVE, Engel J, French J, Glauser TA, Mathern GW, Moshé SL, Nordli D, Plouin P, Scheffer IE. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: Report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005–2009. *Epilepsia* 2010; 51 (4): 676-685.
10. Berg AT, Shinnar S. Do seizures beget seizures? An assessment of the clinical evidence in humans. *J Clin Neurophysiol.* 1997; 14: 102–110.
11. Bertram EH, Cornett JF. The evolution of a rat model of chronic limbic seizures. *Brain Res.* 1994;661:157-162.
12. Binder DK, and Steinhäuser C. Functional changes in astroglial cells in epilepsy. *Glia.* 2006;54(5):358-68.
13. Bough KJ, Rho JM. Anticonvulsant mechanisms of the ketogenic diet. *Epilepsia* 2007;48(1):43-58.
14. Bough KJ, Valiyil R, Han FT, Eagles DA. Seizure resistance is dependent upon age and calorie restriction in rats fed a ketogenic diet. *Epilepsy Res* 1999; 35 (1): 21-28.
15. Bough KJ, Wetherington J, Hassel B, Pare JF, Gawryluk JW, Greene JG, Shaw R, Smith Y, Geiger JD, Dingledine RJ. Mitochondrial biogenesis in the anticonvulsant mechanism of the ketogenic diet. *Ann Neurol* 2006; 60 (2): 223-235.
16. Campbell SL, Hablitz JJ. Glutamate transporters regulate excitability in local networks in rat neocortex. *Neuroscience* 2004;127:625–635.

17. Campbell SL, Hablitz JJ. Modification of epileptiform discharges in neocortical neurons following glutamate uptake inhibition. *Epilepsia* 2005;46(5): 129–133.
18. Carr AC, Frei B. Toward a new recommended dietary allowance for vitamin C based on antioxidant and health effects in humans. *Am J Clin Nutr* 1999;69:1086–1107.
19. Cavalheiro EA, Fernandes MJ, Turski L, Naffah-Mazzacoratti MG. Spontaneous recurrent seizures in rats: amino acids and monoamines determination in the hippocampus. *Epilepsia* 1994;35: 1–11.
20. Cavalheiro EA, Leite JP, Bortolotto ZA, Turski L. Long-term effects of pilocarpine in rats: structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures. *Epilepsia* 1991; 32: 778–782.
21. Cavalheiro EA. The pilocarpine model of epilepsy. *Ital J Neurol Sci* 1995; 16: 33–37.
22. Chuang YC, Chang AY, Lin JW, Hsu SP, Chan SH. Mitochondrial dysfunction and ultrastructural damage in the hippocampus during kainic acid-induced status epilepticus in the rat. *Epilepsia* 2004;45(10):1202-1209.
23. Clark DD, Sokoloff L. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. Lippincott-Raven, Philadelphia 1999; pp. 637–670.
24. Cock HR, Tong X, Hargreaves IP, Heales SJ, Clark JB, Patsalos PN, Thom M, Groves M, Schapira AH, Shorvon SD, Walker MC. Mitochondrial dysfunction associated with neuronal death following status epilepticus in rat. *Epilepsy Res.* 2002;48(3):157-168.
25. Cohen MR, Ramchand CN, Sailer V, Fernandez M, McAmis W, Sridhara N, Alston C. Detoxification Enzymes Following Intrastratial Kainic Acid. *Neurochem Res.* 1987;12(5):425-429.
26. Costa MS, Rocha JBT, Perosa SR, Cavalheiro EA, Naffah-Mazzacoratti MG. Pilocarpine induced status epilepticus increases glutamate release in rat hippocampal synaptosomes. *Neurosci Lett* 2004; 356: 41– 44.
27. Costello DJ, Delanty N. Oxidative injury in epilepsy: potential for antioxidant therapy? *Expert Rev. Neurother.* 2004;4(3):541-553.
28. Dahlin M, Hjelte L, Nilsson S, Amark P. Plasma phospholipid fatty acids are influenced by a ketogenic diet enriched with n-3 fatty acids in children with epilepsy. *Epilepsy Res.* 2006;73: 199-207.

29. Dal-Pizzol F, Klamt F, Vianna MMR, Shroder N, Quevedo J, Benfato MS, Moreirida JCF, Walz R. Lipid peroxidation in hippocampus early and late after status epilepticus induced by pilocarpine or kainic acid in Wistar rats. *Neurosci Lett.* 2000; 291: 179-182.
30. Eid T, Ghosh A, Wang Y, Beckstrom H, Zaveri HP, Lee TS, Lai JC, Malthankar-Phatak GH, de Lanerolle NC. Recurrent seizures and brain pathology after inhibition of glutamine synthetase in the hippocampus in rats. *Brain* 2008;131:2061-2070.
31. Eisenberg D, Gill HS, Pfluegl GM, Rotstein SH. Structure-function relationships of glutamine synthetases. *Biochim. Biophys. Acta* 2000; 477:122-145.
32. Fernandes JG, Schimidt MI, Monte TL, Tozzi S, Sander JWAS. Prevalence of epilepsy: The Porto Alegre Study. *Epilepsia* 1992; 33(1Suppl):132.
33. Freeman J, Vining EPG, Pillas DJ. *Seizures and Epilepsy in Childhood: A Guide for Parents.* Johns Hopkins University Press, Baltimore, 1990, pp. 151–155.
34. Freitas RM, Tomé AR. Ações neuroprotetoras da vitamina C no corpo estriado de ratos após convulsões induzidas pela pilocarpina. *Rev Psiq Clín.* 2010; 37(3):105-8.
35. Freitas RM, Vasconcelos SMM, Souza FCF, Viana GSB, Fonteles MMF. Oxidative stress in the hippocampus after pilocarpina induced status epilepticus in Wistar rats. *FEBS Journal* 2005; 272: 1307–1312.
36. Freitas RM. Investigation of oxidative stress involvement in hippocampus in epilepsy model induced by pilocarpina. *Neurosci Lett.* 2009; 462: 225–229.
37. French JA, Williamson PD, Thadani VM, Darcey TM, Mattson RH, Spencer SS, Spencer DD. Characteristics of medial temporal lobe epilepsy: I. Results of history and physical examination. *Ann Neurol.* 1993; 34:774–780.
38. Funke MG, Amado D, Cavalheiro EA, Naffah-Mazzacoratti MG. Tyrosine phosphorylation is increased in the rat hippocampus during the status epilepticus induced by pilocarpine. *Brain Res Bull* 1998; 47: 87–93.

39. Funke MG, Costa MS, Amado D, Cavalheiro EA, Naffah-Mazzacoratti MG. Calcium homeostasis and temporal lobe epilepsy. *Arq Neuropsiquiatr* 2003; 61: 8–14.
40. Furtado MA, Braga GK, Oliveira JAC, Vecchio FD, Garcia-Cairdasco N. Behavioral, Morphologic, and Electroencephalographic Evaluation of Seizures Induced by Intrahippocampal Microinjection of Pilocarpine. *Epilepsia* 2002;43(5):37–39.
41. Gomes MM. História da epilepsia: um ponto de vista epistemológico. *J Epilepsy Clin Neurophysiol* 2006; 12 (3):161-167.
42. Guerreiro AC. Guidelines for Drug Treatment of Epilepsy. *Arq Neuropsiquiatr* 2008;66(3-A):591-599.
43. Huttenlocher PR, Wilbourn AJ, Signore JM. Medium-chain triglycerides as a therapy for intractable childhood epilepsy. *Neurology* 1971;21:1097–1103.
44. Jarrett SG, Milder JB, Liang LP, Patel M. The ketogenic diet increases mitochondrial glutathione levels. *J Neurochem.* 2008;106:1044–1051.
45. Kann O, Kovács R. Mitochondria and neuronal activity. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007;292:641-657.
46. Kim do Y, Davis LM, Sullivan PG, Maalouf M, Simeone TA, Van Brederode J, Rho JM. Ketone bodies are protective against oxidative stress in neocortical neurons. *J. Neurochem.* 2007;101(5):1316-1326.
47. Kossoff EH, Freeman JM. The Ketogenic Diet. In: Stafstrom CE, Rho JM. *Epilepsy and the ketogenic diet.* New Jersey:Humana press;2004:p.53-61.
48. Kudin AP, Kudina TA, Seyfried J, Vielhaber S, Beck H, Elger CE, Kunz WS. Seizure-dependent modulation of mitochondrial oxidative phosphorylation in rat hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* 2002;15(7): 1105-1114.
49. Kudin AP, Zsurka G, Elger CE, Kunz WS. Mitochondrial involvement in temporal lobe epilepsy. *Exp Neurol.* 2009; 218: 326–332.
50. Kunz WS, Kudin AP, Vielhaber S, Blumcke I, Zschratte W, Schramm J, Beck H, Elger CE. Mitochondrial complex I deficiency in the epileptic focus of patients with temporal lobe epilepsy. *Ann. Neurol.* 2000; 48 (5): 766-773.
51. Leite JP, Bortolotto ZA, Cavalheiro EA. Spontaneous recurrent seizures in rats: An experimental model of partial epilepsy. *Neurosc Biobehav Rev* 1990; 14: 511–517.

52. Liang LP, Ho YS, Patel M. Mitochondrial superoxide production in kainate-induced hippocampal damage. *Neuroscience* 2000;101(3): 563-570.
53. Liang LP, Patel M. Seizure-induced changes in mitochondrial redox status. *Free Radical Biology & Medicine* 2006;40:316-322.
54. Lothman EW, Bertram EH, Bekenstein JW, Perlin JB. Self-sustaining limbic status epilepticus induced by "continuous" hippocampal stimulation: electrographic and behavioral characteristics. *Epilepsy Res* 1989; 3:107-119.
55. Maalouf M, Sullivan PG, Davis L, Kim DY, Rho JM. Ketones inhibit mitochondrial production of reactive oxygen species production following glutamate excitotoxicity by increasing NADH oxidation. *Neuroscience* 2007;145(1):256-264.
56. MacDonald JF, Mody I, Salter MW. Regulation of N-methyl-D-aspartate receptor revealed by intracellular dialysis of murine neurones in culture. *J. Physiol.* 1989;414:17–34.
57. Massieu L, Haces ML, Montiel T, Hernandez-Fonseca K. Acetoacetate protects hippocampal neurons against glutamate-mediated neuronal damage during glycolysis inhibition. *Neuroscience* 2003;120(2):365-378.
58. Mathern GW, Babb TL, Pretorius J K et al. The pathophysiological relationships between lesion pathology, intracranial ictal EEG onsets, and hippocampal neuron losses in temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* 1995; 21:133-147.
59. Mello LEAM, Cavalheiro EA, Babb TL, Kupfer WR, Pretorius JK, Tan AM, Finch DM, Circuit mechanisms of seizures in the pilocarpine model of chronic epilepsy: cell loss and mossy fiber sprouting, *Epilepsia* 1993; 34:985–995.
60. Michiels C, Raes M, Toussaint O, Remacle J. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 1994;17:235–248.
61. Murata M. Novel therapeutic effects of the anti-convulsant, zonisamide, on Parkinson's disease. *Curr Pharm Des.* 2004;10(6):687-93.
62. Naffah-Mazzacoratti MG, Bellissimo MI, Cavalheiro EA. Profile of prostaglandin levels in the rat hippocampus in pilocarpine model of epilepsy. *Neurochem Int* 1995; 27: 461–466.

63. Nasseh IE, Amado D, Cavaleiro EA, Naffah-Mazzacorsatti MG, Tengan CH. Investigation of mitochondrial involvement in the experimental model of epilepsy induced by pilocarpine. *Epilepsy Res* 2006; 68: 229-239.
64. Nazarewicz RR, Ziolkowski W, Vaccaro PS, Ghafourifar P. Effect of short-term ketogenic diet on redox status of human blood. *Rejuvenat. Res.* 2007;10(4):435-439.
65. Nissinen J, Halonen T, Koivisto E, Pitkanen A. A new model of chronic temporal lobe epilepsy induced by electrical stimulation of the amygdala in rat. *Epilepsy Res* 2000;38:177-205.
66. Noh HS, Hah YS, Nilufar R, Han J, Bong JH, Kang SS, Cho GJ, Choi WS. Acetoacetate protects neuronal cells from oxidative glutamate toxicity. *J. Neurosci. Res.* 2006;83(4):702-709.
67. Nonino-Borges CB, Bustamante VCT, Rabito EI, Inuzuka LM, Sakamoto AC, Marchini JS. Dieta cetogênica no tratamento de epilepsias farmacorresistentes. *Rev. Nutr.* 2004; 17 (4): 515-521.
68. Patel MN. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress: cause and consequence of epileptic seizures. *Free Radic. Biol. Med.* 2004;37(12): 1951-1962.
69. Patel MN. Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunction, and Epilepsy. *Free Radic Res.* 2002;36(11):1139–1146.
70. Raha S, Robinson BH. Mitochondria, oxygen free radicals, disease, and ageing. *Trends Biochem. Sci.* 2000; 25:502–508.
71. Ransom CB, Blumenfeld H. Acquired Epilepsy: Cellular and Molecular Mechanisms. In: Waxman SG. *Molecular Neurology*. London: Elsevier; 2007. p. 360-370.
72. Ravizza T, Gagliardi B, Noé F, Boer K, Aronica E, Vezzani A. Innate and adaptive immunity during epileptogenesis and spontaneous seizures: evidence from experimental models and human temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis* 2008;29: 142–160.
73. Reed DJ, Savage MK. Influence of metabolic inhibitors on mitochondrial permeability transition and glutathione status. *Biochim. Biophys. Acta* 1995;1271(1):43-50.

74. Rismanchi N, Blackstone C (2007) Mitochondrial function and dysfunction in the nervous system. In: Waxman SG. *Molecular Neurology*. London: Elsevier; 2007. p. 29-41.
75. Roberts LJ, Morrow JD. Measurement of F(2)-isoprostanes as an index of oxidative stress in vivo. *Free Radic. Biol. Med.* 2000;28(4):505-513.
76. Rothman SM, Olney JW. Excitotoxicity and the NMDA receptor. *Trends Neurosci.* 1987;10: 299–302.
77. Santos LFL, Freitas RLM, Xavier SML, Saldanha GB, Freitas RM. Neuroprotective actions of vitamin C related to decreased lipid peroxidation and increased catalase activity in adult rats after pilocarpine-induced seizures. *Pharmacol Biochem Behav* 2008; 89: 1–5.
78. Santra S, Gilkerson RW, Davidson M, Schon EA. Ketogenic treatment reduces deleted mitochondrial DNAs in cultured human cells. *Ann. Neurol.* 2004; 56 (5): 662-669.
79. Schwartz RM, Boyes S, Aynsley-Green A. Metabolic effects of three ketogenic diets in the treatment of severe epilepsy. *Dev Med Child Neurol* 1989;31:152–160.
80. Schwechter EM, Veliskova J, Velisek L. Correlation between extracellular glucose and seizure susceptibility in adult rats. *Ann. Neurol.* 2002;53: 91-101.
81. Scorza FA, Arida RM, Naffah-Mazzacoratti MG, Scerni DA, Calderazzo L, Cavalheiro EA. The pilocarpine model of epilepsy: what have we learned? *An. Acad. Bras. Ciênc.* 2009; 81 (3): 345-365.
82. Shin EJ, Ko KH, Kim WK, Chae JS, Yen TPH, Kim HK, Wie, MB, Kim HC. Role of glutathione peroxidase in the ontogeny of hippocampal oxidative stress and kainate seizure sensitivity in the genetically epilepsy-prone rats. *Neurochem Int.* 2008; 52: 1134–1147.
83. Shirasaka Y, Wasterlain CG. Chronic epileptogenicity following focal status epilepticus. *Brain Res* 1994;655:33-44.
84. Stafstrom CE. Animal models of the ketogenic diet: what have we learned, what can we learn? *Epilepsy Res.* 1999; 37 (3): 241-259.
85. Sullivan PG, Rippey NA, Dorenbos K, Concepcion RC, Agarwal AK, Rho JM. The ketogenic diet increases mitochondrial uncoupling protein levels and activity. *Ann. Neurol.* 2004; 55 (4): 576-580.

86. Tomé AR, Feng D, Freitas RM. The Effects of Alpha-Tocopherol on Hippocampal Oxidative Stress Prior to in Pilocarpine-Induced Seizures. *Neurochem Res* 2010; 35: 580–587.
87. Vamecq J, Vallé L, Lesage F, Gressens P, Stables JP. Antiepileptic popular ketogenic diet emerging twists in na ancient story. *Prog Neurobiol.* 2005;75: 1–28.
88. Waldbaum S, Patel M. Mitochondria, oxidative stress, and temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* 2010; 88: 23-45.
89. Wheless JW. History and Origin of the Ketogenic Diet. In: Stafstrom CE, Rho JM. *Epilepsy and the ketogenic diet.* New Jersey:Humana press;2004:p.31-50.
90. White HS. Animal models of epileptogenesis. *Neurology* 2002; 59:7-14.
91. Xavier SML, Barbosa CO, Barros DO, Silva RF, Oliveira AA, Freitas RM Vitamin C antioxidant in hippocampus of adult Wistar rats after seizures and status epilepticus induced by pilocarpine. *Neurosci Lett* 2007;420:76–79.
92. Yamamoto HA, Mohanan PV. Ganglioside GT1B and melatonin inhibit brain mitochondrial DNA damage and seizures induced by kainic acid in mice. *Brain Res.* 2003; 964 (1): 100-106.
93. Ziegler DR, Ribeiro LC, Hagenn M, Siqueira IR, Araújo E, Torres ILS, Gottfried C, Netto CA, Gonçalves CA. Ketogenic Diet Increases Glutathione Peroxidase Activity in Rat Hippocampus. *Neurochem Res.* 2003;28(12):1793–1797.