

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

WANESSA DOS SANTOS PEREIRA

Dieta cetogênica em modelo experimental de epilepsia do lobo temporal

**MACEIÓ
2015**

WANESSA DOS SANTOS PEREIRA

Dieta cetogênica em modelo experimental de epilepsia do lobo temporal

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

Orientadora: **Profa. Dra. Terezinha da Rocha Ataíde**

Co-Orientador: **Prof. Dr. Daniel Leite Góes Gitaí**

MACEIÓ

2015

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

P436d Pereira, Wanessa dos Santos.
Dieta cetogênica em modelo experimental de epilepsia do lobo temporal /
Wanessa dos Santos Pereira, 2015.
93 f. : il.

Orientadora: Terezinha da Rocha Ataíde.

Coorientador: Daniel Leite Góes Gitaí.

Dissertação (mestrado em Nutrição) – Universidade Federal de Alagoas.
Faculdade de Nutrição. Programa de Pós-Graduação em Nutrição. Maceió,
2015.

Bibliografia: f. 83-90.

Apêndices: f. 91-92.

1. Dieta cetogênica. 2. Epilepsia do lobo temporal. 3. Status epilepticus
4. Epilepsia – tratamento. I. Título.



MESTRADO EM NUTRIÇÃO
FACULDADE DE NUTRIÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS



PARECER DA BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
FACULDADE DE NUTRIÇÃO¹
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO²

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO
WANESSA DOS SANTOS PEREIRA

Aos 20 dias do mês de agosto do ano de 2015, reuniu-se na sala Profª Diana Chagas, às 09:00 horas, a banca examinadora de dissertação da mestranda **Wanessa dos Santos Pereira**. A banca foi composta pelos professores doutores Suzana Lima de Oliveira (Examinadora - FANUT/UFAL), Euclides Maurício Trindade Filho (Examinador - UNCISAL), Terezinha da Rocha Ataíde (Orientadora - FANUT/UFAL) e Daniel Leite Goes Gitai (Coorientador - ICBS/UFAL), ao qual coube a presidência dos trabalhos. Aberta a sessão, a mestranda fez uma explanação oral de 40 minutos de sua dissertação de mestrado intitulada: **“O uso da dieta cetogênica em modelo experimental de epilepsia do lobo temporal”**. Em seguida, os membros da referida banca arguiram a mestranda por duas horas e quarenta minutos. Logo após, os membros da banca examinadora, em sessão fechada e secreta, elaboraram o parecer considerando a mestranda aprovada. Sem mais a tratar, Daniel Leite Goes Gitai lavrou a presente ata, que vai assinada por todos os integrantes da banca.

Maceió, 20 de agosto de 2015.

Examinador.

Examinador.

Orientador.

Presidente da banca examinadora.

() **Vide verso:** em caso de alteração do título pela banca examinadora.

Observação: a obtenção do título de mestre está condicionada à submissão do artigo para publicação em periódico indexado e classificado como A1, A2, B1 ou B2, segundo os critérios do sistema *Qualis* da CAPES (<http://qualis.capes.gov.br/webqualis/principal.seam>) específico da Área de Nutrição.

¹Faculdade de Nutrição - FANUT/UFAL
Campus A. C. Simões - Av. Lourival Melo Mota, s/n, Tabuleiro do Martins
CEP 57072-970 - Maceió - AL
Telefone: (082) 3214-1160 / 8146-9213
terezinha.ataide@fanut.ufal.br; suzana.oliveira@fanut.ufal.br

²Programa de Pós-Graduação em Nutrição
PPGNUT/FANUT/UFAL
Telefone: 3214-1158
coordmestnutufal@gmail.com

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter me guiado e iluminado em todos os momentos desta caminhada árdua;

Aos meus pais, Marcos e Fátima que por muitas vezes abdicaram dos seus sonhos para tornar os meus sonhos realidade;

Aos meus irmãos, Danielle e Júnior, por estarem sempre ao meu lado;

Ao meu esposo, Felipe, que apesar de ainda não entender o fundamento da pesquisa científica, vem me acompanhando e dando apoio necessário para que eu possa continuar a minha caminhada;

Aos meus orientadores Prof. Dr. Daniel Gitaí e Profa. Dra. Terezinha da Rocha Ataíde, pelo estímulo à pesquisa, orientação e dedicação ao meu trabalho;

Às minhas companheiras de laboratório, Yngrid, Thalita, Heloísa, Mykaelli, Evelin, Bruna e Lívia pela ajuda no desenvolvimento desta pesquisa;

À Elenita Marinho, pessoa fundamental no cuidado com os animais e que contribuiu para a realização deste trabalho;

E, finalmente, agradeço a todos que me ajudaram direta ou indiretamente para a conclusão desse trabalho.

Um MUITO OBRIGADA a todos vocês!

RESUMO

A DC tem sido indicada para uso em desordens de naturezas distintas, inclusive para epilepsia. Estudos têm mostrado que a DC pode cessar totalmente as crises espontâneas em aproximadamente 30% dos pacientes. Visando contribuir com a discussão do uso da DC na epilepsia, esta dissertação apresenta dois artigos. O primeiro, trata-se de uma revisão da literatura realizada com o objetivo de fornecer uma visão crítica, atual e sistemática dos dados disponíveis relativo ao efeito antiepileptogênico da DC em modelos animais de epilepsia do lobo temporal induzida através de estimulação por pilocarpina ou ácido caínico. Neste estudo, foram incluídos 28 artigos. A extração dos dados foi feita com base em parâmetros metodológicos, comportamentais, eletrofisiológicos, histológicos e moleculares. Observamos que 75% dos estudos utilizaram a DC antes do *Status epilepticus* (SE), como forma de prevenção das crises autossustentadas. Observou-se que a DC leva a um aumento da latência para o surgimento das crises durante o SE e diminui a frequência das crises crônicas. Em relação aos resultados histológicos o efeito da DC é consistentemente observado com a diminuição da morte neuronal nas regiões CA1 e CA3 do hipocampo. No que se refere as análises moleculares, a DC tem ação moduladora na expressão de alguns genes, principalmente aqueles que atuam na apoptose e resposta inflamatória. Observou-se também que esses efeitos apresentam uma correlação positiva com o tempo de tratamento igual ou superior a 4 semanas. O segundo artigo refere-se ao estudo experimental com objetivo de investigar os efeitos da DC à base de óleo de coco no SE induzido por Lítio-Pilocarpina. Neste estudo, o efeito da DC foi investigado no comportamento das crises durante o SE; na neurodegeneração através de histoquímica com Fluoro-jade; 3) astrogliose através nos níveis de expressão de GFAP; e na neuroinflamação através dos níveis de expressão de TNF- α . Os grupos experimentais utilizados foram: PILO, CETO+PILO, CETO e NAIVE. Observou-se que os animais tratados com DC e submetidos ao SE (grupo CETO+PILO) não apresentaram nenhuma diferença significativa em relação ao grupo que recebeu uma dieta normal e que foi submetido ao SE (grupo PILO). A DC diminuiu morte neuronal no hilus do hipocampo, 24horas após a SE. A DC aumentou a astrogliose após 24horas do SE, mas não induziu diferença significativa em relação a inflamação. Estudos adicionais, que utilizem as mesmas perspectivas de nosso trabalho, devem ser realizados de forma a contribuir para compreensão dos mecanismos de ação da DC e aumentar as evidências do uso da DC no contexto da epilepsia.

Palavras-chaves: Dieta cetogênica, Epilepsia do Lobo Temporal e *Status Epileptic*

ABSTRACT

The ketogenic diet (KD) is indicated in the treatment of distinct disorders as the epilepsy. Studies show that KD may cease the spontaneous seizures in approximately 30% of cases. To contribute to the discussion of the use of DC in epilepsy, this dissertation presents two articles. First is a literature review with the objective of providing a critical view, current and systematic data available regarding antiepileptogenic effect of DC in animal models of temporal lobe epilepsy induced by pilocarpine and kainic acid. The extraction of the data was based on methodological, behavioral, electrophysiological, histologic and molecular parameters. Were included 28 articles, 75% of these used the DC before the Status epilepticus (SE) to prevent the seizures during SE. The KD increases latency for the onset of seizures during SE and decreases frequency of chronic crises. The histologic results the effect of KD is consistently observed for decreasing neuronal death in the CA1 and CA3 regions of the hippocampus. Regarding the molecular analysis, the KD has modulating action on the expression of some genes, mainly those related to apoptosis and inflammatory response. It is also noted that these effects are positively correlated with treatment time not less than 4 weeks. Second article refers to experimental study we investigated the effects of KD containing coconut oil in SE induced by Lithium-pilocarpine. In this study, the effect of DC was investigated the behavior of crises during the SE; in neurodegeneration by immunohistochemistry with Fluoro-Jade; astrogliosis via the expression levels of GFAP; and neuroinflammation through TNF- α expression levels. The experimental groups were: PILO, keto + PILO, keto and NAIVE. We observed that animals treated with DC and submitted to the SE (group keto + PILO) showed no significant difference compared with the group receiving a normal diet and underwent SE (PILO group). The DC decreased neuronal death in the hilus of the hippocampus, 24 hours after SE. The DC increased astrogliosis after 24 hours of the SE, but did not induce significant difference inflammation. Additional studies using the same prospects of our work should be performed in order to contribute to understanding the mechanisms of action of DC and increasing evidence of the use of DC in the context of epilepsy.

Keywords: Ketogenic diet, Temporal Lobe Epilepsy and *Status Epilepticus*.

LISTA DE FIGURAS

1º artigo: Dieta cetogênica em modelo animal de epilepsia do lobo temporal: uma revisão sistemática.

Figura 1- Resultado da seleção dos artigos20

2º artigo: Efeito antiepileptogênica da dieta cetogênica à base de óleo de coco em modelo experimental de epilepsia do lobo temporal.

Figura 1- Diferentes secções do hipocampo.....56

Figura 2- Níveis de β -hidroxibutirato semanalmente.....66

Figura 3- Análise da neurodegeneração FJ+ nas regiões Hilus, CA1 e CA3 do hipocampo dos animais do Grupo PILO e DC+PILO 24 horas após SE.....71

Figura 4- Expressão relativa de GFAP por RT-qPCR nos animais dos grupos NAIVE, PILO, CETO+PILO e CETO.....73

Figura 5- Expressão relativa de TNF- α por RT-qPCR nos animais dos grupos NAIVE, PILO, CETO+PILO e CETO.....75

LISTA DE TABELAS

1º artigo: O uso da dieta cetogênica em modelo animal de epilepsia do lobo temporal: uma revisão sistemática.

Tabela 1- Número de estudos que avaliaram o efeito da dieta cetogênica em relação ao início e à duração do tratamento cetogênico.....24

Tabela 2- Efeitos da dieta cetogênica sobre parâmetros comportamentais e eletrográficos, de acordo com a fase epileptogênica e a duração do tratamento.....25

Tabela 3- Efeitos do tratamento cetogênico sobre parâmetros histológicos, de acordo com a fase epileptogênica.....28

Tabela 4- Avaliação do efeito da dieta cetogênica sobre análises moleculares, em diferentes períodos e tecidos.....31

2º artigo: Investigação de ação antiepileptogênica da dieta cetogênica à base de óleo de coco em modelo experimental de epilepsia do lobo temporal.

Tabela 1- Composição das dietas controle e cetogênica.....53

Tabela 2- Composição das dietas padrão para roedores Nuvilab®.....53

Tabela 3- Concentração e quantidade total de RNA extraído de hipocampus esquerdos dos animais do grupo PILO.....60

Tabela 4- Concentração e quantidade total de RNA extraído de hipocampus esquerdos dos animais do grupo CETO+PILO.....60

Tabela 5- Concentração e quantidade total de RNA extraído de hipocampus esquerdos dos animais do grupo CETO.....60

Tabela 6- Concentração e quantidade total de RNA extraído de hipocampus esquerdos dos animais do grupo NAIVE.....61

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	11
2	COLETÂNEA DE ARTIGOS.....	15
2.1	1º artigo: artigo de revisão	
	O uso da dieta cetogênica em modelo animal de epilepsia do lobo temporal: uma revisão sistemática.....	16
2.2	2º artigo: artigo de resultados	
	Investigação de ação antiepiléptogênica da dieta cetogênica à base de óleo de coco em modelo experimental de epilepsia do lobo temporal.....	47
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	83
	REFERÊNCIAS.....	85
	ANEXO.....	96

1 INTRODUÇÃO

Na dieta cetogênica (DC), aproximadamente 80% da energia alimentar são provenientes de lipídeos, presentes em uma proporção média de 4:1 em relação aos demais macronutrientes (carboidratos+proteínas) (VAMECQ *et al.*, 2005). O alto aporte de lipídeos confere uma inversão da rota metabólica a partir da glicose para a geração e o metabolismo de corpos cetônicos (WALDBAUM e PATEL, 2010). A proposta da dieta é simular alterações bioquímicas semelhantes aos períodos de jejum com objetivo terapêutico. De fato, a dieta cetogênica tem sido indicada para uso em desordens de naturezas distintas, tais como defeitos no transporte de glicose, abetalipoproteinemia, mitocondriopatias, alterações na oxidação de ácidos graxos de cadeia longa, defeitos da piruvato carboxilase, estresse cirúrgico, má nutrição, câncer e epilepsia (TRAUL *et al.*, 2000). Particularmente no contexto do tratamento da epilepsia, a sua aplicação foi descrita pela primeira vez em 1921, por Wilder. Estudos tem mostrado que a DC pode cessar, total ou parcialmente, as crises espontâneas em aproximadamente 30% e 50% dos pacientes, respectivamente (THIELE, 2003; YUDKOFF *et al.*, 2007). Além do mais, a DC apresenta a vantagem de produzir menos efeitos colaterais do que o tratamento medicamentoso, particularmente sobre a perda de memória e outras deficiências cognitivas que, frequentemente, acompanham a administração de drogas anti-epiléticas (YUDKOFF *et al.*, 2007).

Apesar dos mecanismos de ação não terem sido, ainda, totalmente esclarecidos, acredita-se que a DC apresenta propriedades neuroprotetoras, o que o torna um método terapêutico alternativo para as doenças relacionadas com os processos de neurodegeneração (CHORAGIEWICZ *et al.*, 2011). Algumas hipóteses têm sido discutidas na tentativa de explicar o efeito anticonvulsivante da DC. Ma, Berg e Yellen (2007) propõem que o mecanismo de ação está relacionado à seguinte sequência de eventos bioquímicos: a redução na produção de ATP pela via glicolítica decorrente do aumento dos níveis de corpos cetônicos, estimulando a abertura dos canais de potássio e reprimindo o influxo de sódio pela bomba de sódio dependente de ATP. Este processo promove a diminuição da excitabilidade neuronal. No entanto esta hipótese não foi testada *in vivo* e configura-se um resultado da cetose aguda.

Por outro lado, o estudo de Bough *et al.* (2006) sugerem que a DC promove um aumento da biogênese mitocondrial, associado à indução de transcritos que codificam proteínas relacionadas às vias da fosforilação oxidativa e do ciclo de Krebs. Tal cenário resultaria em maior estoque de ATP necessário para abastecer as bombas de Na/K-ATPase, estabilizando o potencial de membrana neuronal e, com isso, ocasionando uma maior resistência ao insulto e elevação do limiar convulsivo. No entanto, este achado foi encontrado em modelo de crise aguda e além do mais só poderia ser possível através de uma cetose crônica, devido à meia-vida das mitocôndrias no cérebro de aproximadamente 5 dias, tempo necessário para promover alterações no programa genético (indução de transcritos) e elevações dos depósitos de energia.

O estudo de Masino *et al.* (2011) foi baseado no uso de três linhagens de camundogos transgênicos. Neste estudo a DC suprimiu as convulsões eletrográficas espontâneas em animais com deficiência de adenosina (Adk-Tg) ou com redução do sinal de adenosina (A1R+/-), mas não promoveu nenhum efeito em animais com ausência do receptor de adenosina (A1R -/-). Isto sugere que o receptor de adenosina A1 seja um potente alvo molecular da DC.

Por outro lado, é interessante notar que estudos em modelos experimentais apontam dados controversos sobre a eficácia da dieta na reversão comportamental ou eletrográfica das crises epiléticas (NOH *et al.*, 2006a; NOH *et al.*, 2006b; FENOGLIO-SIMEONE *et al.*, 2009; HANSEN *et al.*, 2009; JEON *et al.*, 2009; BARABAN *et al.*, 2013). Isto se torna evidente, por exemplo, na epilepsia do lobo temporal, a mais prevalente em humanos, cujos modelos experimentais são os mais utilizados na investigação do processo epileptogênico.

A presente dissertação, composta de dois artigos, trata dos efeitos da dieta cetogênica sobre o processo epileptogênico em modelo experimental de epilepsia do lobo temporal. O primeiro artigo, intitulado: **Dieta cetogênica em modelo animal de epilepsia do lobo temporal: uma revisão sistemática**, refere-se a uma revisão sistemática, que tem como objetivos reunir e analisar os achados obtidos a partir de estudos que investigaram o uso da dieta cetogênica como terapêutica nos modelos animais de epilepsia do lobo temporal, induzida por pilocarpina ou ácido caínico. Com isto, pretende-se desenvolver uma visão crítica, atual e sistemática dos dados disponíveis relativos aos efeitos da DC no contexto deste tipo de epilepsia.

O segundo artigo intitula-se: **Investigação da dieta cetogênica à base de óleo de coco quanto ao potencial efeito antiepiléptico, em modelo de epilepsia do lobo temporal.** Trata-se de um estudo experimental envolvendo análises comportamentais, histológicas e moleculares. A partir deste estudo experimental pretende-se investigar as repercussões do consumo de dieta cetogênica rica em TCM, à base de óleo de coco, sobre as alterações comportamentais, histopatológicas e moleculares pertinentes ao processo epileptogênico e/ou somados ao tratamento dietético.

1º artigo: artigo de revisão

PEREIRA, WS; ATAÍDE, TR; GITAÍ, DL. Dieta cetogênica em modelo animal de epilepsia do lobo temporal: uma revisão sistemática.

1 INTRODUÇÃO

A dieta cetogênica (DC) tem sido utilizada como tratamento da epilepsia desde 1921, quando o médico norte-americano, Wilder (1921) relatou, pela primeira vez, a presença de efeitos anticonvulsivantes. Após duas décadas de uso, a dieta cetogênica caiu em desuso devido à descoberta das drogas antiepilépticas (DAE). Na década de 1990, com a observação de epilepsias refratárias, ou seja, as epilepsias resistentes às DAEs, o uso da DC ressurgiu como alternativa de tratamento para as epilepsias de difícil controle (SCHWARTZKROIN, 1999; STAFSTROM, 1999; NONINO-BORGES *et al.*, 2004; GOMES *et al.*, 2011;).

Apesar do pouco conhecimento sobre os mecanismos envolvidos no efeito da DC, muitos estudos em humanos têm demonstrado a eficácia da DC no controle das crises (VILLENEUVE *et al.*, 2009; NEA *et al.*, 2009; COPPOLA *et al.*, 2010; KESSLER *et al.*, 2011; SUO *et al.*, 2013). Em um estudo prospectivo multicêntrico realizado pela Associação Médica Chinesa (*Chinese Medical Association*), em 2013, observou-se que o uso da DC por 3, 6 e 12 meses em crianças diagnosticadas com diversos tipos de epilepsia resultou em redução de 50% na frequência das crises em 38%, 26% e 20% das crianças, respectivamente.

Em um estudo realizado na Austrália, onde avaliaram-se os prontuários de 50 crianças tratadas com DC, entre março de 1999 e maio de 2008, em um período de observação ≥ 6 meses após o início do tratamento, constatou-se que 48% delas tornaram-se livres das crises, 52% tiveram uma redução $\geq 50\%$ na frequência das crises (DRESSLER *et al.*, 2010).

Em outro estudo multicêntrico e retrospectivo na Argentina, observaram-se prontuários clínicos de 216 pacientes que iniciaram a DC entre os dias 01 de março de 1990 e 31 de dezembro de 2010 (a duração média de tratamento foi de 3,5 anos). Os autores constataram que 76 pacientes abandonaram o tratamento dietético, alegando falta de eficácia do tratamento ou problemas adversos, como hipoglicemia, vômitos ou problemas gastrointestinais. No entanto, dos 140 pacientes que permaneceram sob a DC, 22% ficaram livres das crises, 34,5% tiveram uma diminuição de 75-99% da frequência das crises, 10% reduziram as crises em 50-

74% e os 33,5% restantes tiveram uma redução inferior a 50% das convulsões (CARABALLO *et al.*, 2011).

Frente a esses achados, pesquisas em animais têm sido desenvolvidas na tentativa de entender tanto a eficácia quanto os mecanismos de ação da DC no controle das crises. Porém, esses estudos têm apresentado resultados conflitantes no que se diz respeito ao efeito anticonvulsivante da DC (UHLEMANN e NEIMS, 1971; THAVENDIRANATHAN *et al.*, 2000; BOUGH e EAGLES, 2001; BARABAN *et al.*, 2013;). O cenário se torna ainda mais complexo, quando se observa uma grande heterogeneidade de delineamentos experimentais utilizados nestas investigações. Os estudos que correlacionam a DC e epilepsia utilizam diferentes modelos experimentais de indução, de tipo de animal e de composição da DC, além de animais de idades diferentes, o que torna a interpretação dos dados ainda mais desafiadora.

O modelo experimental de indução, que melhor representa o processo epileptogênico e que comina na epilepsia, é do *Status Epilepticus*. Esta condição pode ser estimulada através da utilização de drogas convulsivante como: pilocarpina e ácido caínico.

Assim, numa tentativa de contribuir para o entendimento dos achados relativos a esta questão, a presente revisão sistemática tem como objetivos reunir e analisar criticamente os estudos que o investigaram efeito antiepileptogênico da dieta cetogênica, em modelos animais de epilepsia do lobo temporal induzido através de estimulação química por pilocarpina ou ácido caínico.

2 MÉTODOS

2.1 Critérios de elegibilidade

Critério de inclusão: estudos experimentais que abordaram o uso da dieta cetogênica em modelo experimental de epilepsia do lobo temporal induzido por pilocarpina ou ácido caínico.

A prospecção dos artigos envolveu três ciclos de exclusão. Primeiro, foram excluídos os artigos duplicados, ou seja, aqueles que foram localizados com mais de uma combinação de palavras-chave; em seguida, foram excluídos aqueles que não

atenderam aos critérios de inclusão, tais como artigos de revisão, estudos clínicos em humanos, artigos que abordaram o uso da dieta cetogênica em outro contexto patológico ou em condições normais, modelos experimentais que não utilizaram métodos de indução por pilocarpina ou ácido caínico. Finalmente, foram excluídos os artigos que atenderam ao critério de inclusão, mas focaram em metabólitos isolados da DC, ou utilizaram modelos animais de não roedores, ou escritos em Língua não inglesa, ou que os pesquisadores não tiveram acesso. O resultado dessa etapa está apresentado na figura 1.

2.2 Estratégia de busca

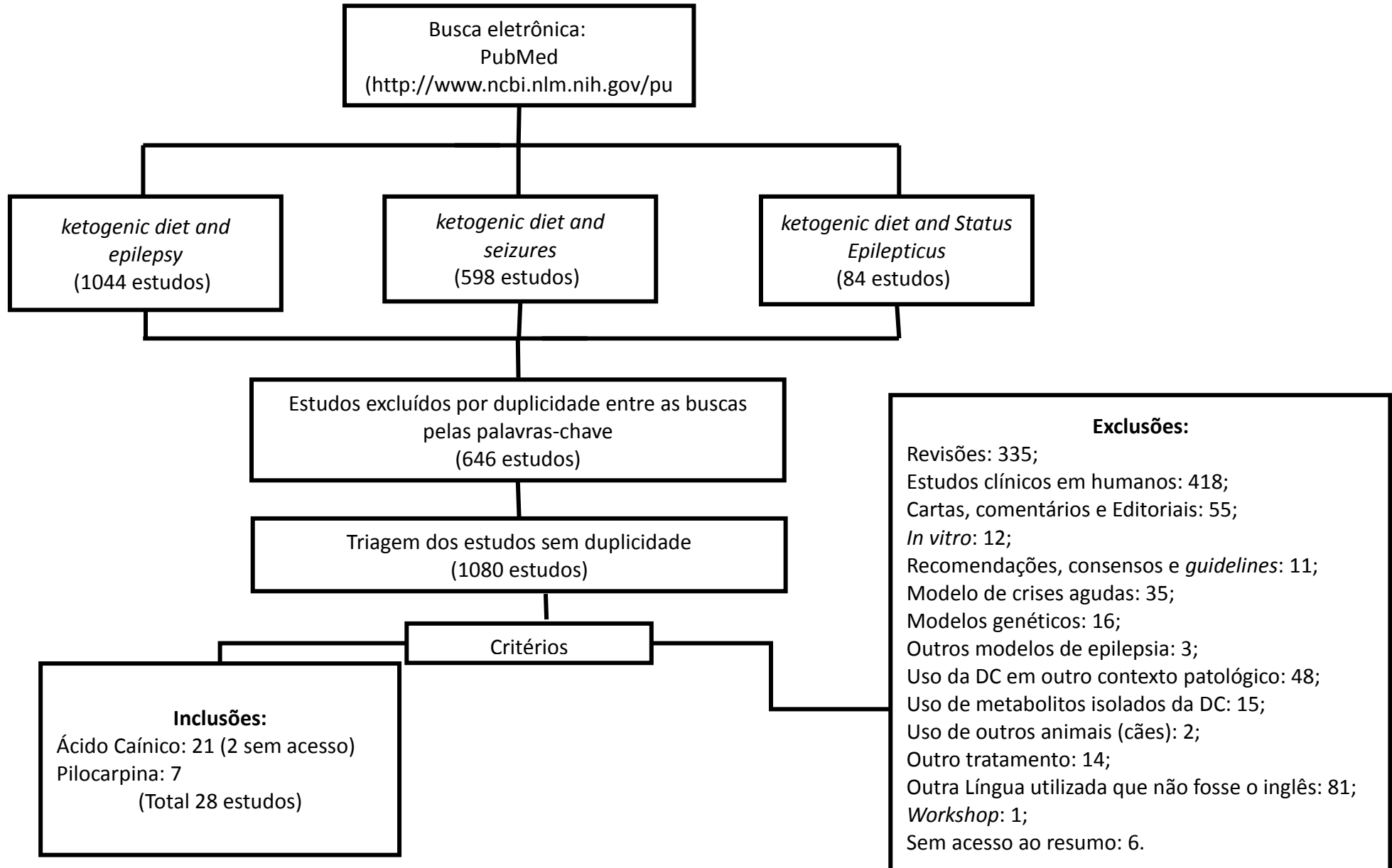
A seleção dos artigos de interesse foi feita utilizando a base de dados Pubmed através do *PubMed* da *U.S. National Library of Medicine* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>), a partir das seguintes combinações de palavras-chave: “*ketogenic diet and epilepsy*”, “*ketogenic diet and Status Epilepticus*” e “*ketogenic diet and Seizures*”.

2.3 Extração dos dados

A extração dos dados foi feita com o auxílio de uma planilha de dados elaborada especialmente para este estudo. Os dados extraídos foram baseados em **parâmetros metodológicos** (modo de indução, tempo de tratamento e fase da epileptogênese analisada), **comportamentais** (latência para *Status Epilepticus*-SE ou Crises Recorrentes e Espontaneas-CREs, número de crises, frequência das crises, duração e severidade das crises durante o SE e fase crônica), **eletrofisiológicos** (latência para o 1º pico de onda, ativação do foco epiléptico, amplitude de onda e frequência de onda), **histológicos** (neudegeneração, neurogênese, astrogliose e brotamento de fibras musgosas) e **moleculares** (expressão gênica diferencial) para posterior confecção dos gráficos e tabelas analisados nesta revisão.

Em decorrência da heterogeneidade tanto de delineamento experimental quanto de variáveis mensuradas nos estudos incluídos, ao invés de realizar uma meta-análise, decidiu-se conduzir uma revisão sistemática dos principais achados nesta
revisão.

Figura 1-Resultado da seleção dos artigos



3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Resultado da pesquisa

Dos 1.726 artigos encontrados, 646 estudos foram excluídos por se tratarem de duplicidade entre as buscas. Os 1080 artigos únicos foram avaliados quanto ao critério de inclusão. Nesta etapa, foram excluídos 1052 artigos, sendo 335 revisões, 418 estudos clínicos em humanos, 55 cartas, editoriais e comentários, 12 estudos *in vitro*, 11 artigos que explanavam consensos, recomendações e *guidelines*, 38 estudos que utilizaram outros modelos experimentais (modelo de pentilenatetrazol-PTZ, estímulo elétrico, *flurohtyl*, entre outros modelos) e 3 estudos que abordavam a dieta cetogênica em outros contextos patológicos (inflamação, câncer, mitocondriopatias, entre outras situações clínicas). Dos 57 artigos que atenderam aos critérios de inclusão, 29 foram excluídos, dentre os quais 15 estudos que avaliaram compostos isolados da DC (ácidos graxos isolados e corpos cetônicos) e 14 estudos que utilizaram outros tratamentos (jejum, dieta restritiva, dieta com baixas calorias e outras). Além do mais, 81 artigos foram excluídos por estarem escritos em outras línguas que não o inglês, 2 estudos que utilizaram outros animais (cães) e por fim 1 estudo que se tratava de resumo de *workshop* e 6 estudos cujo acesso não foi possível. Depois das 3 etapas de exclusão, foram relacionados 28 estudos para compor a revisão sistemática.

3.2 Paradigmas experimentais analisados

Em relação ao aspecto metodológico, foram avaliados os estudos quanto ao período de tratamento dietético e ao momento do processo epileptogênico em que os efeitos foram investigados.

3.3 Duração de Tratamento Dietético

A Tabela 1 associa o momento de administração da dieta cetogênica e a duração do tratamento dietético com a ocorrência de efeito anticonvulsivante, mensurado através de análise comportamental e/ou eletrográfica. Observa-se que a

maioria dos estudos (n=21) utilizaram um tratamento com DC antes da indução do SE. Tais estudos tiveram como objetivo avaliar o efeito da DC na fase aguda inicial da epileptogênese, que compreende as primeiras 24 horas pós-indução do *Status Epilepticus*. Nesta fase, ocorrem mudanças moleculares e estruturais no cérebro, tais como neurodegeneração, astrogliose, inflamação e reorganização da expressão de fatores de transcrição (SCORZA *et al.*, 2009). Postula-se que esses eventos iniciais deflagram alterações subsequentes que culminam na emergência das crises espontâneas e recorrentes. De fato, é sabido que a duração e gravidade do SE influenciam a intensidade das modificações sinápticas, bem como a frequência e a latência para as crises recorrentes e espontâneas (CREs) (LEMOS e CAVALHEIRO, 1995). Assim, as abordagens baseadas em pré-tratamento vêm sendo utilizadas tendo como uma das finalidades reverter ou diminuir o SE ou as suas consequências e, por conseguinte a emergência das CREs. Tal abordagem se insere dentro da perspectiva de tratamento preventivo.

Apenas oito estudos administraram a DC após o SE e somente um na fase crônica. Tais abordagens tiveram como objetivo avaliar o efeito da DC no controle das CREs. Este dado é curioso uma vez que a fase crônica é o paradigma que melhor representa o cenário clínico em pacientes. Uma explicação para isto pode ser de base metodológica, como o tempo de execução do projeto e os custos relacionados ao desenvolvimento do mesmo. Assim, os estudos têm investigado o *Status Epilepticus* e somente depois, dependendo dos resultados, analisam os efeitos nas crises recorrentes e espontâneas. Ao observar outras abordagens de tratamento, como nos testes farmacológicos, é comum a utilização da indução de crises agudas na tentativa de investigar a ação anticonvulsivante do fármaco testado e, somente quando comprovado o seu efeito, utilizam métodos de CRE.

Em relação ao tempo de duração do tratamento com dieta cetogênica, observa-se que o mais utilizado foi de quatro semanas, em 12 estudos (42,8%). Este tempo foi também o que gerou mais dados de efeito positivo da DC em parâmetros comportamentais ou eletrográficos. De fato, 10 estudos apresentaram algum efeito positivo no uso da DC, durante o SE (9 estudos) ou durante a fase crônica (1 estudo). Embora a explicação para o uso da DC por quatro semanas seja empírica, é importante considerar que as pesquisas têm demonstrado que a eficácia máxima da dieta cetogênica só pode ser alcançada após um período de adaptação de vários dias ou semanas, indicando que a proteção contra as crises se processa, muito

provavelmente, por mecanismos genéticos e/ou metabólicos adaptativos e que a sua ação acontece de forma gradual (UHLEMANN e NEIMS, 1972; ROH *et al.*, 1999; STAFSTROM, 1999; BOUGH e RHO, 2007).

É interessante notar que somente 55,55% (5) dos estudos (9) com tratamento dietético por três semanas apresentaram efeito. A explicação para isto precisa ser melhor investigada, ainda mais considerando que o uso da dieta cetogênica por duas semanas é suficiente para aumentar os níveis de corpos cetônicos, o que supostamente estaria associado aos efeitos anticonvulsivantes desse tipo de tratamento (BOUGH e EAGLES, 1999; RHO *et al.*,1999; RAFFO *et al.*,2008).

Tabela 1- Número de estudos que avaliaram o efeito da dieta cetogênica em relação ao início e à duração do tratamento cetogênico.

Início e Duração do Tratamento Cetogênico	Total de estudos/estudos que relatam algum efeito na avaliação comportamental e/ou eletrográfica	
	SE	CRE
Tratamento Pré-SE		
≤ 3 semanas**	9(5)	-
4 semanas	9(8)	-
6 semanas	1 (1)	-
Tratamento Pré e Pós-SE		
3 semanas de Pré e 1 semana pós-SE	2(0)	-
Tratamento Pós-SE		
≤ 3 semanas	1	-
4 semanas*	-	3(2)
6 semanas*	-	2(0)
12 semanas	-	1 (1)
Tratamento durante a fase crônica		
12 semanas	-	1(0)

SE: Status Epilepticus; CRE: crises recorrentes e espontâneas. Tratamento Pré-SE: Tratamento antes da indução dos Status epilepticus(SE); Tratamento pós-SE : tratamento iniciado até 2 dias após o SE; Tratamento Durante a fase crônica: tratamento iniciado 14 dias após o SE; * quatro estudos não avaliaram o comportamento e /ou eletrográfico (2 estudos em 4 semanas e 2 em 6 semanas); ** somente um estudos encontrou efeito negativo da dieta cetogênica sobre o comportamento. Fonte: Autora, 2015.

É importante mencionar que apenas o estudo de Bough *et al.* (2002), (tabela 2) demonstrou um aumento na gravidade das crises durante o SE, utilizando um tratamento dietético com duração de três semanas. No entanto, este estudo avaliou duas vias de administração da droga convulsivante (ácido caínico), a via intraperitoneal e a via subcutânea, utilizando um tratamento cetogênico com restrição calórica. Os autores alegaram que a via subcutânea contribuiu para a gravidade das crises, independente do tratamento dietético, exceto para os animais que foram injectados por via intraperitoneal e alimentados com a dieta normal com restrição calórica, animais que tiveram convulsões mais graves.

Tabela 2- Efeitos da dieta cetogênica sobre parâmetros comportamentais e eletrográficos, de acordo com a fase epileptogênica e a duração do tratamento.

Parâmetros comportamentais e eletrográficos de acordo com a fase epileptogênica	Total de estudos/ Estudos que relatam algum efeito			
	≤ 3 semanas		≥ 4 semanas	
<i>Status Epilepticus</i> (SE)	n	%	n	%
Latência para o início das crises	6(1)	20%	9(8)	88,8%
Duração das Crises	4(0)	0	5(0)	0
Tipo de crise (severidade)*	5(1)	20%	9(0)	0
Latência para 1º pico de onda	4(1)	25%	1(0)	0
Amplitude de onda	2(0)	0	-	-
Frequência de onda	2(0)	0	-	-
Crises Recorrentes e Espontâneas (CRE)	n	%	n	%
Latência para 1º CRE	2(0)	-	1(0)	0
Duração das Crises	-	-	3(0)	0
Tipo de crise (severidade)	-	-	1(0)	0
Frequência das CRE	-	-	6(5)	83,3%
Frequência de onda (EEG)	-	-	1(0)	0

SE: *Status Epilepticus*; CRE: Crises Recorrentes e Espontâneas; DC: Dieta cetogênica. * De acordo com a escala de Racine. Fonte: Autora, 2015.

3.4 Parâmetro comportamental e eletrofisiológico

A tabela 2 ilustra o efeito da DC sobre os parâmetros comportamentais e eletrofisiológicos avaliados nos estudos. Em relação ao *SE*, é interessante notar que somente um estudo mostrou um efeito negativo da DC sobre a gravidade, com maior severidade das crises, ou seja, os animais que receberam o tratamento cetogênico tiveram maior número de crises do nível 5 (evento caracterizado por elevação do corpo e queda), em relação aos animais que receberam uma dieta normal com restrição calórica (BOUGH *et al.*, 2002) e nenhum estudo demonstrou efeito da DC sobre a duração das crises. Este dado sugere que a DC não inibe as crises autossustentadas deflagradas através de estimulação química por pilocarpina ou ácido caínico. De fato, essas crises são bem robustas e difíceis de serem revertidas, mesmo algumas DAEs não apresentam efeitos sobre o *SE*, como no caso das drogas à base de propofol ou fenobarbital, que são fármacos de terceira linha (REDDY e KURUBA, 2013).

O único parâmetro comportamental analisado em mais de um estudo, durante o *SE*, que mostrou efeito da DC foi a latência para o início de crises. Observa-se que a maioria dos estudos (9 de 15, considerando os todos os estudos que avaliaram o *SE*) mostraram um aumento no tempo de latência, indicando que a DC retarda o estabelecimento do *SE*, embora não afete a gravidade e a duração das crises. O significado biológico e clínico desse achado é complexo e ainda não compreendido, sobretudo quando se observa que alguns estudos (6 de 15) mostraram dados conflitantes na análise desse parâmetro. Por outro lado, é interessante notar que em quase todos os estudos que constataram mudança positiva neste parâmetro comportamental, os animais foram submetidos ao tratamento com DC por um período igual ou maior a quatro semanas e somente um estudo, que utilizou duração de tratamento menor que três semanas, constatou efeito.

A ação da DC na fase crônica foi investigada em nove estudos, porém somente seis estudos utilizaram o parâmetro comportamental. Destes, cinco estudos mostraram que a DC diminui a frequência das crises. O único trabalho que não mostrou efeito sobre este parâmetro iniciou o tratamento cetogênico mais tardiamente, em relação ao *SE*. Neste caso, o tratamento foi iniciado 14 dias pós-indução do *SE* (SU *et al.*, 2000), enquanto os outros estudos começaram o tratamento em 24h pós-indução (ZHAO *et al.*, 2004), 48h pós-*SE* (XU, SUN e JIM,

2006; XU, SUN e JIM, 2008) e imediatamente após o SE (KOBOW et al., 2013), Portanto, pode-se possível sugerir que o início do tratamento deve ser realizado o mais precocemente possível, após o SE. No entanto, mais estudo são necessários. De qualquer forma, os estudos sugerem uma ação antiepileptogênica da DC. Esses achados estão em concordância com os obtidos em pacientes com o uso isolado da DC (DRESSLER et al., 2010; CARABALLO et al., 2011; CARABALLO et al., 2013; KANG et al., 2013; LEE et al., 2013) ou associado às DAEs (LI et al., 2013).

3.5 Análises Histológicas

Dos 28 estudos selecionados para esta revisão, somente 13 analisaram os efeitos da dieta cetogênica em alterações histológicas sabidamente envolvidas no processo epileptogênico. Os processos pato-histológicos avaliados foram neurodegeneração (12 dos 13 estudos), brotamento da fibra musgosa (3 dos 13 estudos), neurogênese (1 dos 13 estudos) e a astrogliose (1 dos 13 estudos). Em relação à neurodegeneração, observou-se que, com exceção de quatro estudos (KWON et al., 2008; SAMALA, WILLIS e BORGES, 2008; SU et al., 2000; ZHAO et al., 2004), os demais estudos mostraram uma diminuição da perda neuronal em animais que foram submetidos o SE, a maioria com tratamento com dieta cetogênica igual ou maior que quatro semanas; destes, somente um estudo utilizou uma duração de tratamento de três semanas (tabela 3). É importante salientar as áreas cerebrais onde foi observada a diminuição da morte neuronal. Nos estudos de Luan et al. (2012) e Jeon et al. (2009) observaram que a DC atenuou a perda neuronal apenas na região CA3 do hipocampo. No entanto, outros seis estudos mostraram que a DC promoveu diminuição na morte neuronal nas regiões CA1 e CA3 do hipocampo (NOH et al., 2003; NOH et al., 2005a; NOH et al., 2005b; NOH et al., 2006a; LINARD et al., 2010; KOBOW et al., 2013). Apesar dos mecanismos neuroprotetores da DC ainda não estarem totalmente esclarecidos, foi levantada a hipótese de que a DC diminui a perda neuronal por influenciar vias metabólicas envolvidas na morte celular dependente mitocôndrias (NOH et al., 2008). De fato, tem sido sugerido que a DC modula a gênese de mitocondrial, assim como atenua a formação de espécies reativas de oxigênio (MAALOUF et al., 2007; BOUGH et al., 2006).

Tabela 3- Efeitos do tratamento cetogênico sobre parâmetros histológicos, de acordo com a fase epileptogênica

Parâmetros histológico de acordo com a fase epileptogênica	Total de estudos/ Estudos que relatam algum efeito			
	≥ 4 semanas		Todos os estudos#	
<i>Fase aguda*</i>	n	%	n	%
Neurodegeneração ^a	6(5)	83,33%	8(6)	75%
Neurogênese ^b	1(1)	100%	1(1)	100%
Astroglíose ^c	1(0)	0	1(0)	0
<i>Fase Crônica**</i>	n	%	n	%
Neurodegeneração ^a	3(1)	33,33%	4(2)	50%
Brotamento de Fibras Musgosas ^d	2(0)	0	2(0)	0

***Fase aguda**: corresponde ao *Status epilepticus (SE)* e até 48 pós-SE; o pré-tratamento foi usado (tratamento antes da indução do SE); **Fase crônica**: corresponde ao estabelecimento das crises recorrentes e espontâneas (CRE); o tratamento utilizado foi pós-SE. Durante esta fase somente 1 estudo utilizou 3 semanas de pré-tratamento mais 1 semana de tratamento pós-SE, totalizando 4 semanas; no entanto, analisou o tecido neuronal após o aparecimento das CRE. **Métodos utilizados para os parâmetros histológicos**: **a**: Tionina, coloração de Nissl, detecção de Neun (Imunohistoquímica), Flouoro-Jade, Violeta de cresyl e TUNEL; **b**: BrdU; **c**: Detecção de GFAP por imunohistoquímica; **d**: TIMM; #: A quantidade total de estudos para a fase crônica é igual ao número de estudos que utilizaram um tratamento ≥ 4 semanas. Fonte: Autora, 2015.

Em relação ao brotamento da fibra musgosa e astroglíose, nenhum estudo mostrou diferença entre o grupo de animais submetidos ao tratamento com DC e os animais que receberam dieta padrão, pós-SE (Tabela 3). Este dado é interessante pois o dano cerebral induzido pelo SE provocado pelo insulto químico resulta em perda neuronal acompanhada de proliferação das células da glia e brotamento das fibras musgosas (BABB, 1991). Os resultados sugerem, portanto, que a neuroproteção induzida pela DC não impede ou diminui a astroglíose ou o brotamento das fibras musgosa.

Observa-se que em relação à neurogênese, somente um estudo avaliou este processo e constatou que a DC aumentou significativamente o número de neurônios em relação ao controle (KWON et al., 2008). Apesar da relação da neurogênese e da epileptogênese ainda não está totalmente esclarecida, os estudos sugerem que este processo não pode ser considerado totalmente positivo, pois a neurogênese pode contribuir para novas conexões aberrantes, favorecendo a hiperexcitabilidade (STAFSTROM, 2004; no entanto, essa correlação ainda não foi estudada utilizando a DC como tratamento da epilepsia.

3.6 Análise Molecular

Com base nos estudos selecionados, observa-se que somente 12 estudos utilizaram uma abordagem molecular. O parâmetro utilizado foi de estudo de expressão genica diferencial após tratamento com DC nos modelos experimentais de epilepsia do lobo temporal. Na tabela 4, tem-se a lista das hipóteses avaliadas pelos autores de acordo com o gene escolhido. É importante considerar, que nesta tabela, foram excluídos os dados obtidos a partir de ferramentas de análise em larga escala sem validação. Como esperado, essas análises foram feitas majoritariamente em hipocampus, embora outras estruturas do sistema nervoso central também tenham sido contempladas, tais como: córtex frontal e posterior, cerebelo, corpo estriado, região pré-óptica, tálamo e neocórtex.

Os genes avaliados estão associados aos seguintes processos biológicos: morte celular, na condição de pró-apoptótico (8) ou antiapoptótico (6), inflamação (5), metabolismo do glutamato (2), resposta imune (1) ou na geração de energia via estimulação da oxidação de ácidos graxos (1).

A maioria dos genes analisados tiveram uma expressão diferencial, seja superexpressão ou subexpressão, em relação ao grupo controle que recebeu uma dieta normal. De uma maneira geral os genes pró-apoptóticos, que geralmente estão superexpressos, tiveram sua expressão diminuída após o tratamento com a DC, tais como: p-Bad, citocromo c, caspase-3, caspase-9, SMAC/DIABLO, Clusterin, além da superexpressão de genes associados à ação anti-apoptótica, corroborando com o achado histológico, onde a DC diminuiu a morte neuronal.

Observa-se que os genes relacionados com a inflamação, como TNF- α , CD11b, NFK-KB e COX-2 estão subexpressos em animais tratados com DC, em relação aos animais controles. Este dado sugere que a DC minimiza o processo inflamatório durante a epileptogênese; no entanto, as principais células responsáveis por liberar essas citocinas inflamatórias, os astrócitos, expressos pela identificação da astrogliose, não foram diminuídos quando utilizada a DC como tratamento (KWON *et al.*, 2008).

É interessante mencionar que todos esses achados moleculares utilizaram a dieta cetogênica clássica, à base de triglicerídeos de cadeia longa, como tratamento dietético. Este de composição dietética é capaz e proporcionar mudanças na

expressão de genes importantes no processo epileptogênico. Mas, também constata-se a falta de estudos com dieta cetogênica à base triglicérido de cadeia média, impedindo avaliar o efeito desta composição dietética no contexto da epilepsia.

Esses achados moleculares permitem sugerir que a dieta cetogênica clássica, à base de triglicéridos de cadeia longa, no contexto da epilepsia do lobo temporal, induzida experimentalmente, contribui para a expressão de transcritos de forma diferencial, em processos relacionados com o surgimento e/ou agravamento das crises, como no caso de genes relacionados com inflamação e morte neuronal. Apesar dos resultados expressivos, são necessários mais estudos que comprovem o efeito da DC na expressão diferencial desses e de outros genes relacionados com a epileptogênese. Além do mais, é necessária uma maior padronização das escolhas dos métodos de análises, assim como do tratamento cetogênico, uma vez que os estudos tendem a diferir entre as dietas utilizadas, a duração de tratamento, entre outras características. Isto impede que os resultados possam ser analisados de forma conjunta. Diante disto, os resultados aqui apresentados devem ser cuidadosamente observados.

Tabela 4- Avaliação do efeito da Dieta cetogênica sobre análises moleculares, em diferentes períodos e tecidos

Nome do Gene	Nº gene <i>ontology</i>	Processo biológico na epilepsia- <i>Ontology</i>	Hipótese do Autor em relação à epileptogênese	Tempo	Tecido	Método	Efeito		Referência
							Epil. X Ñ epil	DC Epil. X DN Epil	
GluR5 (Grik5)	0007268	Regulação da transmissão sinapse	Transmissão sináptica excitatória	Fase crônica	Hipocampo	<i>Westen Blot</i>	NF	↑	Xu, Sun, e Jim (2006)
						RT-PCR	NF	(-)	Xu, Sun, e Jim (2006)
						RT-PCR	NF	(-)	Xu, Sun, e Jim (2008)
GluR6 (Grik2)	0048169	Regulação da plasticidade sináptica neuronal a longo prazo (Fibras musgosas)	Transmissão sináptica excitatória	Fase crônica	Hipocampo	RT-PCR	NF	↑	Xu, Sun, e Jin (2008)
CALB1 (Calbidin D28k)	0051480 0048167	Homeostase do cálcio no citosol; Regulação da plasticidade sináptica;	Reduz o acúmulo de cálcio dentro da célula	2 dias pós-SE	Hipocampo	Imunohistoquímica	↓	↑	Noh <i>et al.</i> (2005a)

Nome do Gene	Nº gene <i>ontology</i>	Processo biológico na epilepsia- <i>Ontology</i>	Hipótese do Autor em relação à epileptogênese	Tempo	Tecido	Método	Efeito		Referência
							Epil. X Ñ epil	DC Epil. X DN Epil	
CaMKK2	0019722 0045893	Sinalização mediada pelo cálcio; Regulação da transcrição do DNA	Reduz o acúmulo de cálcio dentro da célula	Fase crônica	Hipocampo	Metilação de DNA (Bisulfite)	NF	↓ Hipermetilação	Kobow <i>et al.</i> (2013)
						RT-PCR	NF	↑	
Citocromo C (CitC)	0033554	Resposta celular ao estresse;	Induz apoptose	24H Pós-SE	Hipocampo	<i>Western Blot</i>	↑	↓	Luan <i>et al.</i> (2012)
Caspase-9	0006508 0006915 0042981	Processo apoptótico;	Induz apoptose	24H Pós-SE	Hipocampo	Atividade protease	↑	↓	Luan <i>et al.</i> (2012)
Caspase-3	0034349	Processo apoptótico	Induz apoptose	24H Pós-SE	Hipocampo	Atividade protease	↑	↓	Luan <i>et al.</i> (2012)
				2h pós-SE		<i>Western Blot</i>	↑	↓	Noh <i>et al.</i> (2006a)
				2 dias pós-SE		RT-PCR	↑	↓	Noh <i>et al.</i> (2003)
Imunohistoquímica	NF	↓(CA1 e CA3)							

Nome do Gene	Nº gene ontology	Processo biológico na epilepsia- <i>Ontology</i>	Hipótese do Autor em relação à epileptogênese	Tempo	Tecido	Método	Efeito		Referência
							Epil. X Ñ epil	DC Epil. X DN Epil	
Smac / DIABLO	0006915 0051402 0008635	Processo apoptótico (Via mitocôndria, citoC), Sinaliza a caspase; Apoptose de células neuronais	Induz apoptose	24H Pós-SE	Hipocampo	<i>Western Blot</i>	↑	↓	Luan <i>et al.</i> (2012)
HSP70 (HSPBP1 e HSPA6)	0006457 0006200 0042026	Enovelamento de proteínas; Processo catabólico do ATP; Redobramento de proteínas desnaturada	Marcador bioquímico da lesão neural (apoptose)	2 dias pós-SE	Hipocampo	<i>Western Blot</i>	↑	↓	Jeon <i>et al.</i> (2009)
Bax	1901030 0006915 0097193	Processo apoptótico	Induz a apoptose	2h pós-SE	Hipocampo	<i>Western Blot</i>	NF	(-)	Noh <i>et al.</i> (2006b)

Nome do Gene	Nº gene <i>ontology</i>	Processo biológico na epilepsia- <i>Ontology</i>	Hipótese do Autor em relação à epileptogênese	Tempo	Tecido	Método	Efeito		Referência
							Epil. X Ñ epil	DC Epil. X DN Epil	
Bad + Bcl-XL (bad+Bcl-2)	1900740 0006915 0097193	Processo apoptótico	Induz a apoptose	2h pós-SE	Hipocampo	<i>Western Blot</i>	↑	↓	Noh <i>et al.</i> (2006b)
CLuN (Clusterin)	0008219	Morte celular (Necrose);	Induz a apoptose	2 dias pós-SE	Hipocampo	<i>Western Blot</i>	NF	↓	Noh <i>et al.</i> (2005b)
						Imunohistoquímica	NF	(-)	
p-Akt	-	Fosforilação de Bad	Inibe a apoptose	2h pós-SE	Hipocampo	<i>Western Blot</i>	↓	↑	Noh <i>et al.</i> (2006b)
p-Bad+14-3-3	1900740 0006915 0097193 1900740	Processo Apoptótico;	Inibe a apoptose	2h pós-SE	Hipocampo	<i>Western Blot</i>	↓	↑	Noh <i>et al.</i> (2006b)
PPARy	0002674 0019395	Regulação da resposta inflamatória Aguda (↓); Oxidação de gordura	Ação anti-inflamatória	2h e 6h	Hipocampo	<i>Western Blot</i>	↑ (2h)	↓(2h)	Jeong <i>et al.</i> (2011)
						Imunohistoquímica	↑	↑	

Nome do Gene	Nº gene ontology	Processo biológico na epilepsia- <i>Ontology</i>	Hipótese do Autor em relação à epileptogênese	Tempo	Tecido	Método	Efeito		Referência
							Epil. X Ñ epil	DC Epil. X DN Epil	
Il10rb	0006955 0004920 0006954	Resposta imune; Atividade do receptor de IL-10; Resposta inflamatória;	Ação anti-inflamatória	Fase crônica	Hipocampo	Metilação de DNA (Bisulfite)	NF	Hipometilação foi revertida	Noh <i>et al.</i> (2006b)
						RT-PCR	NF	(-)	
TNF- α	0008630	Sinalização de apoptose, em resposta ao dano no DNA	Induz a inflamação	2h e 6h pós-SE	Hipocampo	<i>Western Blot</i>	↑	↓(2h)	Jeong <i>et al.</i> (2011)
NFK-B (1)	0050728 0006915	Regulação a resposta inflamatória; - Processo apoptótico;	Induz a inflamação	2h e 6h pós-SE	Hipocampo	Imunohistoquímica	↑	↓	Jeong <i>et al.</i> (2011)
CD11b	-	Marcador da microglia em processo inflamatória contra insulto	Induz a inflamação	2h e 6h pós-SE	Hipocampo	<i>Western Blot</i>	↑(6h)	↓(6h)	Jeong <i>et al.</i> (2011)

Nome do Gene	Nº gene ontology	Processo biológico na epilepsia-Ontology	Hipótese do Autor em relação à epileptogênese	Tempo	Tecido	Método	Efeito		Referência
							Epil. X Ñ epil	DC Epil. X DN Epil	
COX-2	0006979	Resposta ao estresse oxidativo; Atividade da peroxidase;	Induz a inflamação	2h e 6h pós-SE	Hipocampo	Western Blot	↑(6h)	↓(6h)	Jeong <i>et al.</i> (2011)
	Imunohistoquímica					↑(6h)	↓(6h)		
NFK-B (1)	0050728 0006915	Regulação a resposta inflamatória; Processo apoptótico;	Induz a inflamação	2h e 6h pós-SE	Hipocampo	Imunohistoquímica	↑	↓	Jeong <i>et al.</i> (2011)
Cathepsin E	0019886 0016540 0006508	- Processamento de antígeno e a apresentação de antígeno via do MHC de classe II; Processamento de proteínas; Proteólise;	Induz a resposta imune	Fase crônica	Córtex frontal, Córtex posterior, Striatum, Hipocampo, Tálamo, Tronco cerebral, Cerebelo, Septo, e a Área pré-óptica	RT-PCR	↑	↓	Jeong <i>et al.</i> (2010)
						Imunohistoquímica	↑ (todas as áreas do cérebro, exceto no tronco cerebral)	↓ (todas as áreas do cérebro, exceto no tronco cerebral)	

Nome do Gene	Nº gene ontology	Processo biológico na epilepsia- <i>Ontology</i>	Hipótese do Autor em relação à epileptogênese	Tempo	Tecido	Método	Efeito		Referência
							Epil. X Ñ epil	DC Epil. X DN Epil	
JIP-1 (MAPK8IP)	0046328 0009967	Regulação da JNK cascata; Transdução de sinal;	Reorganização da expressão gênica	3h pós-SE	Hipocampo	<i>Western Blot</i>	↑(3h)	↑(3h)	Noh <i>et al.</i> (2006b)
JNK-1 (MAPK8)	0007258 2001235	Fosforilação de JUN; Processo apoptótico	Reorganização da expressão gênica	3h pós-SE	Hipocampo	<i>Western Blot</i>	↑(3h)	(-)	Noh <i>et al.</i> (2006b)
p-JNK-1	-	Fosforilação de proteína	Reorganização da expressão gênica	3h pós-SE	Hipocampo	<i>Western Blot</i>	↑(3h)	↓(3h)	Noh <i>et al.</i> (2006b)
JUN	0051090	Regulação do DNA de transcrição atividade do fator de sequência específica;	Reorganização da expressão gênica	3h pós-SE	Hipocampo	<i>Western Blot</i>	↑(3h)	↓(3h)	Noh <i>et al.</i> (2006b)
FOS	0006355 0043565	Regulação da transcrição; Liga-se a sequência de DNA específico;	Reorganização da expressão gênica	3h pós-SE	Hipocampo	<i>Western Blot</i>	↑(3h)	↓(3h)	Noh <i>et al.</i> (2006b)

Nome do Gene	Nº gene <i>ontology</i>	Processo biológico na epilepsia- <i>Ontology</i>	Hipótese do Autor em relação à epileptogênese	Tempo	Tecido	Método	Efeito		Referência
							Epil. X Ñ epil	DC Epil. X DN Epil	
AP-1	-	Complexo se liga ao DNA promovendo a transcrição	Reorganização da expressão gênica	3h pós-SE	Hipocampo	EMSA	↑	↓	Noh <i>et al.</i> (2006b)
PENK	0007218	Via de sinalização de neuropeptídeo;	-	3h pós-SE	Hipocampo	Hibridação <i>in situ</i>	↑	↓	Noh <i>et al.</i> (2006b)
			Reorganização da expressão gênica; - Contribuir com as crises, pois o glutamato coexiste com péptidos opióides derivados de PENK			Northern Blot	↑	↓	
pS6 (S6)	0004711	Proteína S6 ribossomal quinase (crescimento celular)	Reorganização da expressão gênica	1d, 7d e 21d pós-SE	Hipocampo, neocórtex e fígado	Western Blot	NF	↑(1d); ↓(7d); ↓(21d)-Hipo; e Neo;	McDaniel <i>et al.</i> (2011)
						Imunohistoquímica	NF	↓(CA3); ↓(Neo)	

Nome do Gene	Nº gene ontology	Processo biológico na epilepsia-Ontology	Hipótese do Autor em relação à epileptogênese	Tempo	Tecido	Método	Efeito		Referência
							Epil. X Ñ epil	DC Epil. X DN Epil	
p-AMPK	0044281 0006853 0006112	Metabolismo celular de lipídeos; Mecanismo da carnitina Processo metabólico de reserva de energia	Regula a adaptação celular ao stress metabólico	2 dias pós-SE	Hipocampo	Western Blot		(-)	Jeon <i>et al.</i> (2009)
p-ACC	-	Biossíntese de ácidos graxos	Estimula a lipogênese	2 dias pós-SE	Hipocampo	Western Blot	↑	↓	Jeon <i>et al.</i> (2009)

(-) Não foi encontrado nenhum efeito. SE: *Status Epilepticus*; CRE: Crises recorrentes e espontâneas. Epil.x Ñ Epil: grupo epiléptico **versus** grupo não epiléptico; Epil.x DÑ Epil: grupo epiléptico com tratamento de dieta cetogenica **versus** grupo não epiléptico com dieta padrão para roedores. Fonte: Autora, 2015

4 CONCLUSÃO

Neste trabalho, realizou-se uma revisão sistemática na tentativa de contribuir para o entendimento dos efeitos da dieta cetogênica sobre a epilepsia do lobo temporal em modelos experimentais. Todos os dados extraídos dos estudos selecionados para esta revisão foram metodologicamente separados por critérios, tais como: parâmetros comportamental, eletrofisiológicos, histológicos e moleculares. Observou-se no âmbito comportamental que a DC leva a um aumento da latência para o surgimento das crises durante o SE e diminui a frequência das crises crônicas. Em relação aos resultados histológicos, o efeito da DC consistentemente observado foi a diminuição da morte neuronal nas regiões CA1 e CA3 do hipocampo. Finalmente no que diz respeito às análises moleculares, a DC tem ação moduladora sobre alguns genes, principalmente aqueles que atuam na apoptose e resposta inflamatória. Observou-se também que esses efeitos apresentam uma associação com o tempo de tratamento igual ou superior a quatro semanas.

Apesar dos resultados apresentados nesta revisão, é importante apontar para a grande heterogeneidade das metodologias utilizadas nos diversos estudos, principalmente em relação as formas de indução do *Status Epilepticus* e as variáveis comportamentais escolhidas pelos autores. Essas divergências metodológicas impedem uma melhor comparação entre os resultados e análise mais robusta através, por exemplo, de uma metanálise.

De qualquer forma, fazem-se necessárias novas pesquisas neste campo experimental, na tentativa de pontuar os reais efeitos desse tratamento dietético sobre a epilepsia do lobo temporal e proporcionar aos portadores de epilepsia de difícil controle mais uma opção terapêutica seguramente testada.

5 REFERÊNCIA

- BABB, T.L. Bilateral pathological damage in temporal lobe epilepsy. **Can J Neurol Sci.** v. 18, Suppl. 4, p. 645-8, 1991;
- BARABAN, S. C. et al. Drug screening in Scn1a zebrafish mutant identifies clemizole as a potential Dravet syndrome treatment. *Nat Commun.* v.4, p.2410, 2013;
- BOUGH, K.J. *et al.* An anticonvulsant profile of the ketogenic diet in the rat. **Epilepsy Research.** v. 50, p. 313-325, 2002;
- BOUGH, K.J. *et al.* Mitochondrial Biogenesis in the Anticonvulsant Mechanism of the Ketogenic Diet. **Ann Neurol.** v.60, p.223–235, 2006;
- BOUGH, K. J; EAGLES, D. A. A ketogenic diet increases the resistance to pentylentetrazole-induced seizures in the rat. **Epilepsia.** v. 40, n 2, p. 138-43,1999;
- BOUGH, K. J. e EAGLES, D. A. Comparison of the anticonvulsant efficacies and neurotoxic effects of valproic acid, phenytoin, and the ketogenic diet. **Epilepsia** v. 42, n. 10, p. 1345-53, 2001;
- BOUGH, K. J; RHO, J.M. Anticonvulsant mechanisms of the ketogenic diet. **Epilepsia.** v. 48, n. 1, p. 43-58, 2007;
- CAPPOLA, G. *et al.* Ketogenic diet for the treatment of catastrophic epileptic encephalopathies in childhood. **European journal of pediatric neurology.** v.14, p. 229–234, 2010;
- CARABALLO, R. H. *et al.* Febrile infection-related epilepsy syndrome: a study of 12 patients. **Seizure.** v.22, n. 7, p. 553-9, 2013;
- CHINESE MEDICAL ASSOCIATION. Prospective multicenter study on long-term ketogenic diet therapy for intractable childhood epilepsy. **Zhonghua Er Ke Za Zhi.**v.51, n. 4, p. 276-82, 2013;
- DRESSER, A. *et al.* Long-term outcome and tolerability of the ketogenic diet in drug-resistant childhood epilepsy--the Austrian experience. **Seizure.** v.19, n.7, p. 404-8, 2010;
- CARABALLO, R. *et al.* Long-term follow-up of the ketogenic diet for refractory epilepsy: multicenter Argentinean experience in 216 pediatric patients. **Seizure.** n.8, p. 640-5, 2011;
- FENOGLIO-SIMEONE, K.A., *et al.* Ketogenic diet treatment abolishes seizure periodicity and improves diurnal rhythmicity in epileptic Kcna1-null mice. *Epilepsia.* v. 50, n.9, p. 2027-34, 2009.

GOMES, T. K. C. *et al.* O Papel da dieta cetogênica no estresse oxidativo presente na epilepsia experimental. **J Epilepsy Clin Neurophysiol.** v. 17, n. 2, p. 54 – 64, 2011;

HANSEN, S.L. *et al.* Ketogenic diet is antiepileptogenic in pentylenetetrazole kindled mice and decrease levels of N-acylethanolamines in hippocampus. **Neurochem Int.** v. 54, n.3-4, p. 199-204, 2009;

JEON, B. T. *et al.* Ketogenic diet attenuates kainic acid-induced hippocampal cell death by decreasing AMPK/ACC pathway activity and HSP70. **Neurosci Lett.** v. 453, n. 1, p.49-53, 2009;

JEONG, E.A. *et al.* Ketogenic diet-induced peroxisome proliferator-activated receptor- γ activation decreases neuroinflammation in the mouse hippocampus after kainic acid-induced seizures. **Exp Neurol.** v. 232, n. 2, p. 195-202, 2011;

LI, B.M. *et al.* Influence of ketogenic diet on the clinical effects and electroencephalogram features in 31 children with pharmacoresistant epileptic encephalopathy. **Zhonghua Er Ke Za Zhi.** v.51, n. 5, p. 362-6, 2013;

LINARD, B. *et al.* Ketogenic diet exhibits neuroprotective effects in hippocampus but fails to prevent epileptogenesis in the lithium-pilocarpine model of mesial temporal lobe epilepsy in adult rats. **Epilepsia.** v. 51, n. 9, p. 1829-36, 2010;

LEE, J. *et al.* Prognostic factors of infantile spasms: role of treatment options including a ketogenic diet. **Brain Dev.** v. 35, n. 8, p. 821-6, 2013;

LEMONS, T; CAVALHEIRO, E. A. Suppression of pilocarpine-induced status epilepticus and the late development of epilepsy in rats. **Exp Brain Res.** v. 102, p. 423-28, 1995;

LUAN G. *et al.* Ketogenic diet reduces Smac/Diablo and cytochrome c release and attenuates neuronal death in a mouse model of limbic epilepsy. **Brain Res Bull.** v. 89, n. 3-4, p. 79-85, 2012;

YUDKOFF, M. *et al.* The ketogenic diet and brain metabolism of amino acids: relationship to the anticonvulsant effect. **Annual Review of Nutrition.** v. 27, p. 415-430, 2007;

KANG, J. W. *et al.* Seizure outcome of infantile spasms with focal cortical dysplasia. **Brain Dev.** v. 35, n. 8, p. 816-20, 2013;

KESSLER, S.K. *et al.* Early EEG Improvement after Ketogenic Diet Initiation. **Epilepsy Res.** v.94, n.1-2, p. 94–101, 2011;

KOBOW, K. *et al.* Deep sequencing reveals increased DNA methylation in chronic rat epilepsy. **Acta Neuropathol.** v.126, p.741–756, 2013;

KWON, Y. S. *et al.* Effects of the keto.genic diet on neurogenesis after kainic acid-induced seizures in mice. **Epilepsy Res.** v. 78, n. 2-3, p. 186-94, 2008;

MA, W; BERG, J; YELLEN, G. Ketogenic diet metabolites reduce firing in central neurons by opening KATP channels. **The Journal of Neuroscience**. v.47, n.14, p. 3618–3625, 2007;

MAALOUF, M. *et al.* Ketones inhibit mitochondrial production of reactive oxygen species production following glutamate excitotoxicity by increasing NADH oxidation. **Neuroscience**. v. 145, n. 1, p. 256-64. 2007;

MCDANIEL, S.S. *et al.* The ketogenic diet inhibits the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway. **Epilepsia**. v. 52, n.3, p. 7-11, 2011;

MASINO, S. A. *et al.* A ketogenic diet suppresses seizures in mice through adenosine A1 receptors. *The Journal of Clinical Investigation*. v. 121, n.7, p. 2548-2683, 2011. **Epilepsia** v.50, n. 5, p.1109–1117, 2009;

NEAL, E. G. *et al.* A randomized trial of classical and medium-chain triglyceride ketogenic diets in the treatment of childhood epilepsy. **The lancet neurology**. v. 7, p 500-506, 2008;

NOH, H. S. *et al.* The protective effect of a ketogenic diet on kainic acid-induced hippocampal cell death in the male ICR mice. **Epilepsy Res**. n. 53, p.1-2, 2003;

NOH, H. S. *et al.* Ketogenic diet increases calbindin-D28k in the hippocampi of male ICR mice with kainic acid seizures. **Epilepsy Res**. v. 65, n. 3, p.153-9, 2005a;

NOH, H. S. *et al.* Ketogenic diet prevents clusterin accumulation induced by kainic acid in the hippocampus of male ICR mice. **Brain Res**. v. 1042, n.1, p.114-8, 2005b;

NOH, H. S. *et al.* Ketogenic Diet Protects the Hippocampus From Kainic Acid Toxicity by Inhibiting the Dissociation of Bad From 14-3-3. **J Neurosci Res**. v. 84, n.8, p.1829-36, 2006a;

NOH, H. S. *et al.* Ketogenic diet decreases the level of proenkephalin mRNA induced by kainic acid in the mouse hippocampus. **Neurosci Lett**. v. 395, n.1, p. 87-92. 2006b;

NOH, H. S. *et al.* Neuroprotective effects of the ketogenic diet. **Epilepsia**. n. 8, p. 120-8, 2008;

NONINO-BORGES, C. B. *et al.* The ketogenic diet on the treatment of drug resistant epilepsies. **Rev. Nutr**. v.17, n. 4, p. 515 – 521, 2004;

RAFFO, E. *et al.* Calorie-restricted ketogenic diet increases thresholds to all patterns of pentylenetetrazol-induced seizures: critical importance of electroclinical assessment. **Epilepsia**. v. 49, n. 2, p. 320-8. 2008;

REDDY D. S.; KURUBA, R. Experimental models of status epilepticus and neuronal injury for evaluation of therapeutic interventions. **Int. J. Mol. Sci**. v. 14, p.18284-18318, 2013;

- RHO, J. M. *et al.* Age-dependent differences in flurothyl seizure sensitivity in mice treated with a ketogenic diet. **Epilepsy Research**. v. 37, p. 233 – 240, 1999;
- RHO, J. M. *et al.* Age-dependent differences in flurothyl seizure sensitivity in mice treated with a ketogenic diet. **Epilepsy Research**. v. 37, p. 233 – 240, 1999;
- SAMALA, R; WILLIS, S.; BORGES, k. Anticonvulsant profile of a balanced ketogenic diet in acute mouse seizure models. **Epilepsy Res**. v. 81, n. 2-3, p.119-27, 2008;
- SCHWARTZKROIN, P.A. Mechanisms underlying the anti-epileptic efficacy of the ketogenic diet. **Epilepsy Res**. v. 37, n. 3, p.171-80, 1999;
- SCORZA, F. A. *et al.* The pilocarpine model of epilepsy: what have we learned? **An. Acad. Bras. Ciênc**. v. 81, n. 3, p. 345-365, 2009;
- STAFSTROM, C. E. Animal models of the ketogenic diet: what have we learned, what can we learn? **Epilepsy Research**. v. 37, p. 241 – 259, 1999;
- STAFSTROM, C.E. Dietary approaches to epilepsy treatment: old and new options on the menu. **Epilepsy Curr**. v. 4, n. 6, p.215-22, 2004;
- SU, W. S. *et al.* Timing of ketogenic diet initiation in an experimental epilepsy model. **Developmental Brain Research**. v. 125, p.131–138, 2000;
- SUO, C. *et al.* Efficacy and safety of the ketogenic diet in Chinese children. **Seizure**. v. 22, n. 3, p. 174-8, 2013;
- THAVENDIRANATHAN, P. *et al.* The MCT ketogenic diet: effects on animal seizure models. **Exp Neurol**. v.161, n. 2, p. 696-703, 2000;
- THIELE, E.A. Assessing the efficacy of antiepileptic treatments: the ketogenic diet. **Epilepsia**. v.44, p.26–29, 2003;
- TRAU, K. A. *et al.* Review of the toxicologic properties of medium-chain triglycerides. **Food Chem Toxicol**. v. 38, p. 79-98, 2000;
- UHLEMANN, E.R; NEIMS, A.H. Anticonvulsant properties of the ketogenic diet in mice. *J Pharmacol Exp Ther*. v.180, p. 231–8, 1972;
- VAMECQ, J. *et al.* Antiepileptic popular ketogenic diet emerging twists in an ancient story. **Prog Neurobiol**. v. 75, p.1–28, 2005;
- VILLENEUVE, N. *et al.* The ketogenic diet improves recently worsened focal epilepsy. **Dev Med Child Neurol**. v. 51, n. 4, p.276-81, 2009;
- WALDBAUM, S.; PATEL, M. Mitochondrial oxidative stress in temporal lobe epilepsy. **Revista de epilepsia**. v. 88, n. 1, p. 23-45, 2010;
- WILDER, R.M. The effects of ketonemia on the course of epilepsy. *Mayo Clin Proc*. n. 2, p.307–308, 1921;

XU, X.; SUM, R; JIM, R. Effect of ketogenic diet on hippocampus mossy fiber sprouting and GluR5 expression in kainic acid induced rat model. **Chin Med J (Engl)**. v. 20,n. 119, p. 22, 2006;

XU, X.; SUM, R; JIM, R. The effect of the ketogenic diet on hippocampal GluR5 and Glu(6 mRNA expression and Q/R site editing in the kainate-induced epilepsy model. **Epilepsy Behav**. v. 13, n. 3, p. 445-8, 2008;

ZHAO, Q. *et al*. Detrimental effects of the ketogenic diet on cognitive function in rats. **Pediatr Res**. v. 55, n. 3, p. 498-506, 2004;

2º artigo: artigo de resultados

PEREIRA, WS; ATAÍDE, TR; GITAÍ, DLG. Efeito antiepiléptico da dieta cetogênica à base de óleo de coco em modelo experimental de epilepsia do lobo temporal.

1 INTRODUÇÃO

A epilepsia é uma condição do sistema nervoso central, caracterizada pela ocorrência periódica e espontânea de atividade elétrica altamente sincronizada acompanhada de manifestações comportamentais (NONINO-BORGES *et al.*, 2004). A Liga Internacional Contra a Epilepsia (ILAE) classifica essa patologia, de acordo com sua etiologia, em: a) idiopáticas, aquelas que não apresentam lesão detectável no sistema nervoso e de caráter genético, b) sintomáticas, que apresentam substrato lesional e, c) criptogênicas, onde se desconhece a etiologia, porém sugerem que as mesmas possuem substrato lesional (ILAE, 1989).

Dentre as epilepsias sintomáticas, a Epilepsia do Lobo Temporal (ELT) é mais frequente em humanos, particularmente em adolescentes e adultos (GASTAUT *et al.*, 1975; ENGEL *et al.*, 1997; ENGEL, 2001). Aproximadamente 60% dos casos de ELT correspondem à epilepsia do lobo temporal mesial (ELTM), sendo a forma mais comum está associada à esclerose hipocampal (ELTM-EH), presente em 50-70% dos pacientes fármaco-resistentes (ANDRADE-VALENÇA *et al.*, 2006).

O processo epileptogênico em pacientes portadores desse tipo de epilepsia consiste tipicamente de 3 fases: a) um insulto inicial (tais como injúria cerebral decorrente de convulsão febril); b) um período de latência (epileptogênese), em que não há manifestação comportamental de crise; e c) período crônico, caracterizado pela ocorrência de crises espontâneas e recorrentes (CREs) (MATHERN *et al.*, 1996). No que diz respeito ao modelo experimental de epilepsia induzido por pilocarpina, o processo epileptogênico promove mudanças eletroencefalográficas e comportamentais que podem ser divididas em três períodos distintos: a) um período agudo que evolui progressivamente para *Status Epilepticus* 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 (CAVALHEIRO, 1995).

Quanto a histopatologia, cerca de 70% dos pacientes com ELTM-EH apresentam lesões que incluem degeneração neuronal, astrogliose, neurogênese, dispersão das células granulares e rearranjos axonais, como brotamento da fibra musgosa (SHARMA *et al.*, 2007).

Cerca de 70% dos pacientes portadores de ELT são refratários ao tratamento farmacológico disponível atualmente, mesmo quando utilizada uma combinação de

dois ou mais anticonvulsivantes. Nestes casos, a remoção cirúrgica da área epileptogênica (lobotomia) é a única alternativa para a remissão ou controle das crises, sendo que 20% dos pacientes continuam apresentando crises (ENGEL, 2001; KOSSOFF *et al.*, 2008). Assim, torna-se necessária a exploração de tratamentos alternativos, como uso de dieta cetogênica (DC) (NONINO-BORGES *et al.*, 2004).

Dieta cetogênica é caracterizada pelo alto teor de lipídeos, em proporção média de 4:1 (lipídeos:carboidratos+proteínas), com relação aos demais macronutrientes (VAMECQ *et al.*, 2005). Inicialmente, a DC era formulada com composição lipídica de triglicerídeos de cadeia longa (TCL), sendo identificada como dieta cetogênica clássica; porém, recentemente, desenvolveu-se a dieta cetogênica à base de triglicerídeos de cadeia média (TCM). Ambas produzem o efeito de acidose metabólica (cetonemia e cetonúria), após o seu consumo (NEAL *et al.*, 2008). Embora os dois tipos de DC promovam o mesmo efeito metabólico, a dieta que contém TCM rende mais cetonas por quilocaloria de energia fornecida do que aquela que contém TCL, pois os TCM são absorvidos mais rapidamente e ainda são levados diretamente do aparelho digestivo para o fígado pela veia porta. O aumento do potencial cetogênico dos triglicerídeos de cadeia média significa que menos gordura total é necessária na dieta, o que possibilita a inclusão de mais carboidratos e proteínas (LUCENA *et al.*, 2010).

A DC já foi testada em humanos com epilepsia de origem genética e apresentou efeitos positivos para o controle das crises (THIELE, 2003; YUDKOFF *et al.*, 2007; NEAL *et al.*, 2009; VILLENEUVE *et al.*, 2009; COPPOLA *et al.*, 2010; KEEIN *et al.*, 2010; KESSLER *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2013; SUO *et al.*, 2013; Chinese Medical Association, 2013). Em relação à ELT, os dados são motivadores. De fato, em humanos, o uso da DC pode diminuir a frequência das crises epiléticas ou até mesmo cessá-las (THIELE, 2003; YUDKOFF *et al.*, 2007; KEEIN *et al.*, 2010; DRESSLER *et al.*, 2010; CARABALLO *et al.*, 2011; KESSLER *et al.*, 2011), apresentando a vantagem de produzir menos efeitos colaterais que o tratamento medicamentoso, particularmente sobre a perda de memória e outras deficiências cognitivas que, frequentemente, acompanham a administração de drogas anti-epiléticas (YUDKOFF *et al.*, 2007).

Em modelos experimentais de ELT, também foi observado um efeito na diminuição da frequência das CREs (SU *et al.*, 2000; XU; SUN; JIM, 2006; XU; SUN;

JIM, 2008; KOBOW *et al.*, 2013) e na neurodegeneração (NOH *et al.*, 2003; NOH *et al.*, 2005a; NOH *et al.*, 2005b; NOH *et al.*, 2006a; JEON *et al.*, 2009; LINARD *et al.*, 2010; LUAN *et al.*, 2012). Por outro lado, a maioria dos estudos não mostram efeito da DC sobre a duração ou severidade das crises durante o *Status Epilépticus*, (NOH *et al.*, 2003; NOH *et al.*, 2005a; LIAN *et al.*, 2007; KWON *et al.*; 2008; LUAN *et al.*, 2012). Apesar da disponibilidade de vários estudos sobre a ação da DC em modelo experimental de ELT, a grande maioria tem focado numa análise pontual e isolada de determinados parâmetros comportamentais. De fato, apenas um estudo analisou de forma integrada o efeito da DC em aspectos comportamentais, histopatológicos e moleculares da ELT induzida através de pilocarpina (KOBOW *et al.*, 2013). A carência de tais estudos tem limitado a compreensão dos efeitos antiepiletogênicos da DC. No que diz respeito à clínica, um aspecto que tem limitado o uso terapêutico da dieta cetogênica é a descontinuidade do tratamento em decorrência de determinados efeitos colaterais, tais como diarreia, dores abdominais, alteração de humor, hipoglicemia, náuseas e vômitos (CARABALLO *et al.*, 2011). Devido à dificuldade na adesão de alguns pacientes faz-se necessário encontrar alternativas que modifiquem as características organolépticas da DC, tornando-a mais palatável. Neste sentido, o óleo de coco, devido à sua palatabilidade e propriedades funcionais, apresenta-se como uma alternativa na formulação de uma dieta de difícil tolerância, altamente restritiva e pouco palatável.

De fato, os óleos de coco e de palma constituem importantes fontes de TCM, que frequentemente são utilizadas para os diversos fins, inclusive terapêuticos. O óleo proveniente do *Cocos nucifera* L., particularmente, fruto abundante na região Nordeste do Brasil, inclusive em Alagoas, apresenta elevada proporção de ácidos graxos saturados, especialmente de ácido láurico (12:0; 45-50%) (LI *et al.*, 1990). Esse produto é bastante utilizado na indústria química e de cosméticos, devido a sua resistência à oxidação, ao seu baixo ponto de fusão e a sua propriedade de formar emulsões estáveis, além de suas propriedades antivirais, antifúngicas e bactericidas, especialmente atribuídas ao ácido láurico. Além disso, observou-se um alto potencial antioxidante desse óleo na proteção da LDL (Lipoproteína de Baixa Densidade) contra o estresse oxidativo induzido por oxidantes fisiológicos, efeito atribuído ao seu conteúdo em polifenóis (NEVIN; RAJAMOHAN, 2004).

Neste sentido, o objetivo do trabalho foi investigar os efeitos anticonvulsivantes e neuroprotetor da DC à base de óleo de coco em ratos submetidos ao SE induzido

por Lítio-Pilocarpina. O estudo pretende investigar as repercussões do consumo de dieta cetogênica rica em TCM, à base de óleo de coco, sobre as alterações comportamentais, histopatológicas e moleculares pertinentes ao processo epileptogênico e/ou somados ao tratamento dietético.

2 MÉTODOS

2.1 Animais

Neste estudo foram utilizados 51 ratos machos *Wistar*, desmamados aos 30 dias de vida, oriundo BIOCEN/UFAL. Os animais foram mantidos, no biotério setorial da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Alagoas (FANUT/UFAL), em gaiolas individuais, em temperatura ambiental, entre 20-24°C, e ciclo claro/escuro de 12 horas, com alimentação e água *ad libitum*.

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Alagoas, sob o número de protocolo 034-2013 (Anexo 01), vinculado ao Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde (CNS/MS/Brasil), baseado em normas internacionais (Declaração Universal dos Direitos do Animal, UNESCO, 15/10/1978) e nacionais (Lei 6.638 de 08/05/1979).

2.1.1 Grupos experimentais:

Neste estudo foram estabelecidos quatro grupos experimentais:

1. **Dieta normal para roedores + PILO (PILO):** animais ($n= 16$) sob dieta padrão para roedores, injetados com 30mg/kg de pilocarpina pela via intraperitoneal (i.p.) para indução do SE;
2. **Dieta cetogênica + PILO (CETO+PILO):** animais ($n =17$) submetidos a 30 dias de DC. Após este período de tratamento, os animais foram submetidos a injeção de pilocarpina (30mg/Kg, i.p.) para indução do SE;
3. **Dieta Cetogênica (CETO):** animais ($n=18$) submetidos a 30 dias de DC e que não foram submetidos ao SE;
4. **NAIVE:** animais ($n=6$) sem manipulação, sob dieta padrão. Foram estabelecidos somente para as análises moleculares.

Para a composição dos grupos experimentais, inicialmente os animais de 30 dias de idade foram pesados e divididos em dois grupos, em: considerando-se o peso inicial para não induzir diferenças ponderais entre os grupos, **Grupo PILO**: 16 animais com média de peso de 68,38g continuaram sendo tratados com dieta padrão para roedores; **Grupo Cetogênico**: 35 animais com média de peso de 73,08g foram submetidos ao tratamento com dieta cetogênica à base de óleo de coco. Este tratamento foi realizado por 30-32 dias, a partir do 30º dia de vida do animal. Após o tratamento com DC, os 35 animais do grupo Cetogênico foram subdivididos para compor os grupos **CETO+PILO** ($n=17$) e **CETO** ($n=18$). Para este agrupamento, considerou-se o ganho de peso total, ingestão total, ingestão total de energia e coeficiente de eficiência alimentar, de modo a não induzir diferenças entre os grupos. Os animais do grupo 1 que estavam sob dieta padrão passaram a compor o grupo experimental **PILO**.

2.2 Preparação das dietas

A Tabela 1 apresentam as composições da dieta AIN-93G (REEVES, 1997) e da dieta cetogênica a base de óleo de coco.

Para a composição da DC utilizou-se óleo de soja Liza® (Cargill do Brasil) e a margarina Qualy® (Sadia), adquiridos no comércio local. Os demais ingredientes foram fornecidos pela RHOSTER Indústria e Comércio Ltda., São Paulo.

A dieta cetogênica foi elaborada no Laboratório de Nutrição experimental da Faculdade de Nutrição da UFAL. Todos os ingredientes foram misturados para formar uma massa homogênea que, em seguida, foram oferecidas aos animais, do grupo cetogênico, ou foram armazenadas sob refrigeração, por uma semana. .

A dieta padrão para roedores Nuvilab® (Tabela 2) foi fornecida pelo Biotério Central da UFAL e armazenada conforme recomendações do fabricante.

A dieta cetogênica à base de óleo de coco foi composta de 69,79% de lipídeos ($n=35$), já a dieta padrão para roedores tinha em sua composição 16,4% de lipídeos. A dieta cetogênica à base de óleo, sua constituição, foi baseada a partir da dieta AIN-93G (REEVES, 1997). O quadro 1 descreve a composição das dietas.

As dietas padrão para roedores e cetogênica apresentaram as proporções lipídeos:carboidratos+proteína de 1:11,8 e 3,5:1, respectivamente.

Tabela 1- Composição das dietas controle e cetogênica

Constituintes (g/kg)	AIN-93G¹	Dieta Cetogênica à base de coco³
Amido de milho	497,50	0
Amido de milho dextrinizado	132,0	0
Caseína	200	200
Celulose	50	50
Mix mineral AIN-93G	35	35
Mix vitamínico AIN-93G	10	10
L-cisteína	3	3
L-metionina	1,6	1,6
Bitartarato de colina	2,5	2,5
<i>t</i> -Butilidroquinona (mg/kg)	0,014	139,58
Óleo de soja	70	70
Óleo de coco	0	227,9
Margarina	0	400
Valor energético (Kcal/Kg) ²	3.828	7.012,73

¹Conforme Reeves (1997), valores aproximados. ²Valores estimados conforme Atwater e Bryant (1900). ³Composição baseada na dieta AIN-93G.

Tabela 2- Composição das dietas padrão para roedores Nuvilab®

Composição	
Umidade (máx)	12,5%
Proteína Bruta (min)	22,0%
Extrato Etéreo (min)	4,5%
Matéria Mineral (máx)	10,0%
Matéria Fibrosa (máx)	8,0%
Cálcio (máx)	1,4%
Fósforo (min)	0,8%
Lisina	100,0mg
Metionina	300,0mg
Antioxidante	100,0mg
Valor energético (Kcal/Kg) ²	3000

²Estimado conforme Atwater e Bryant (1900)

2.2.1 Acompanhamento do peso corporal e da ingestão alimentar

Os animais tiveram livre acesso à água e à dieta e foram pesados semanalmente, a partir do dia da implantação das dietas experimentais até o final do período experimental. Para a mensuração do peso corporal foi utilizada uma balança digital (Marte, modelo S-100). A ingestão alimentar foi estimada a cada semana, com base na cota de dieta ofertada, nas sobras e nos desperdícios.

2.2.2 Eficiência alimentar

A qualidade global das dietas oferecidas e sua repercussão no desenvolvimento ponderal dos animais, designada de eficiência alimentar, foi calculada para o período de 30-32 dias de tratamento dietético, até a indução do Status Epilepticus, através da fórmula:

$$CEA = (GP/IT) \times 100 \text{ onde:}$$

CEA: coeficiente de eficiência alimentar;

GP: ganho de peso (g) no período de 30-32 dias até a indução do *Status Epilepticus*;

IT: ingestão total (g).

2.3 Mensuração dos níveis de β -Hidroxiacetato (β HB)

Seis animais dos grupos CETO+PILO e CETO e 5 animais do grupo PILO foram submetidos, semanalmente (por 4 semanas), à mensuração dos níveis de β HB. Para tanto, foi coletada uma gota de sangue da cauda dos animais, com ajuda de uma lanceta, e para a leitura utilizou-se o monitor de cetose sanguínea Optium Xceed e as Tiras-teste de β -cetona (Laboratório Abbott do Brasil LTDA).

2.4 Indução do *Status Epilepticus*

Os ratos foram submetidos o SE por meio de injeção i.p. de cloreto de lítio (127 mg/kg), 18-24 horas antes da administração i.p. de pilocarpina (PILO), na dose de 30mg/kg. Para limitar os efeitos periféricos da administração de PILO, foram

injetados, 30 minutos antes da injeção da droga (PILO), o butilbrometo de escopolamina (1mg/kg, i.p).

Logo após a administração de pilocarpina, os animais foram monitorados durante 90 minutos, utilizando-se uma filmadora digital (DCR-SR68, Sony Brasil LTDA). Para a caracterização do início do *SE*, o critério utilizado foi a ocorrência de crises contínuas que se sustentassem durante o tempo mínimo de cinco minutos após a injeção de pilocarpina (LOWENSTEIN e ALLDREDGE, 1998 ; SHORVON, 1994). Após uma hora de *SE* foi realizada a reposição hidroeletrólítica, através de injeção intraperitoneal de soro fisiológico a 0,9% (1ml para cada animal). Para a reversão do *SE*, os animais foram tratados com diazepam (5 mg/kg), por via intraperitoneal, após um período de 90 minutos. A dose de diazepam foi repetida à medida que o animal, após 30min, não cessasse totalmente o *SE*.

2.2 Eutanásia

Os animais foram eutanasiados, às 13 horas, após 24horas da reversão do *SE* para os grupos PILO e CETO+PILO e no período equivalente para os animais do grupo CETO (grupo de animais que não foram submetidos ao *SE*). Foram utilizados dois procedimentos de eutanásia, de acordo com a adequabilidade aos protocolos experimentais. Para análises histoquímicas, animais dos grupos PILO (n=5) e CETO+PILO (n=6), foram eutanasiados utilizando o tiopental sódico (0,4ml/kg de peso, i.p.), enquanto que para as análises moleculares, os animais (PILO n=5; CETO+PILO n=6; CETO n=6; Naive n=6) foram eutanasiados por meio da câmara de CO_2 seguida de decaptação por guilhotina.

2.4 Avaliação comportamental do *Status Epilepticus*

As crises epiléticas, de cada animal foram classificadas de acordo com a escala de crises límbicas estabelecida por Racine (1972) ,representada na tabela 3 .

Quadro 1- Escala comportamental de crises límbicas de Racine (1972).

NÍVEIS DAS CRISES	<p>0 – Comportamento Normal.</p> <p>1 – Automatismos faciais.</p> <p>2 – Mioclonias de cabeça.</p> <p>3 – Clonias uni ou bilaterais das patas anteriores.</p> <p>4 – Clonias das patas anteriores com elevação sobre as patas posteriores.</p> <p>5 – Elevação das patas anteriores e queda atônica com crises clônicas generalizadas.</p>
--------------------------	--

Fonte: Racine, 1972 (Adaptado).

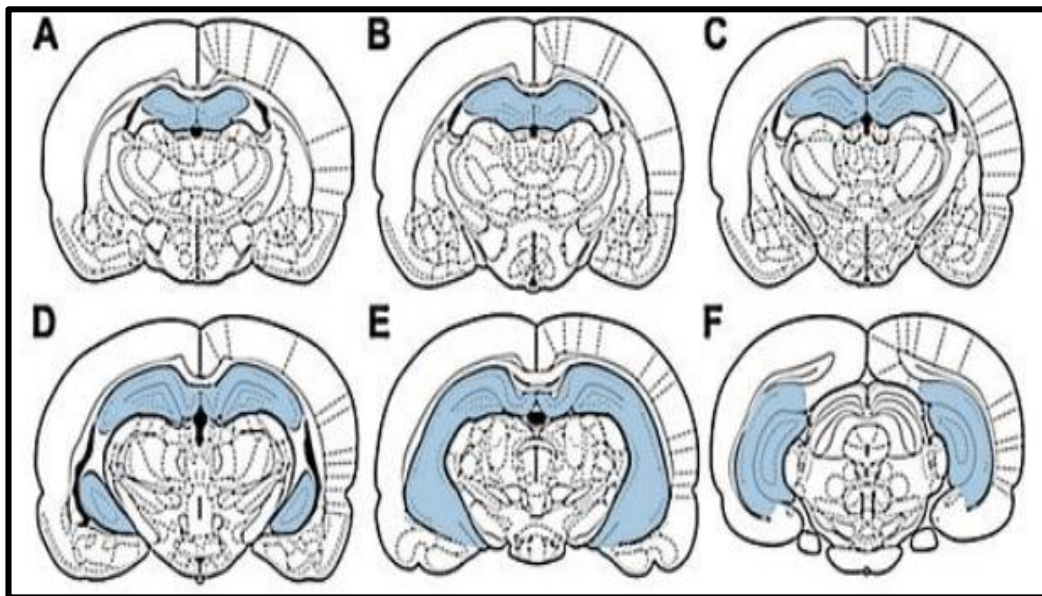
Para a análise das crises convulsivas, as seguintes variáveis foram avaliadas: latência da primeira crise [tempo (seg.) transcorrido entre a injeção de pilocarpina e a primeira crise convulsiva epiléptica]; número de crises antes do *SE* (durante a latência); latência do *SE* [tempo (seg.) transcorrido entre a injeção de pilocarpina e a crise convulsiva epiléptica continuada (5 minutos), característica do *SE*]; frequência das crises de nível 5 durante o *SE* (número de crises do nível de nível 5 durante o *SE*) e, número de doses de diazepam necessárias para abortar o *SE*.

2.5 Histologia

Foi utilizado o método Fluore-jade, para avaliar o efeito da DC no processo de neurodegeneração. Vinte e quatro horas pós-*SE*, os animais foram anestesiados com tiopental sódico (0,4ml/kg) e submetidos à perfusão transcardíaca, sendo usados 150mL de tampão fosfato salina (PBS, 100 mM, pH 7,4) e 300mL de paraformaldeído (PFA, 4%) em PBS. Após a perfusão, os cérebros foram coletados e fixados em PFA por 4h. Após esse período, o material foi transferido para uma solução crioprotetora de sacarose a 20% a uma temperatura de 20°C. Após 2h, os cérebros foram congelados a temperatura de -80°C, por 24h. Posteriormente, os tecidos foram cortados em 30µm em criostato (Leica CM 1850) sob as temperaturas de -18 a -22°C. Os cortes foram colocados em lâminas gelatinizadas (solução para gelatinização: gelatina 0,5% e sulfato de cromo-alumínio 0,05%), cada qual com 6 áreas cerebrais espaçadas de 1mm, em 24 jogos consecutivos adjacentes, e armazenadas a -20°C para as análises histológicas.

As secções coronais foram feitas seguindo os níveis apresentados na figura 1, tendo como referência o bregma, de acordo com o atlas estereotático de Paxinos e Watson (1996). Os seis cortes por nível representam a extensão anteroposterior do hipocampo, adjacentes e armazenadas a -20°C para as análises histológicas (Fluore-jade).

Figura 1- Diferentes secções do hipocampo



Extensão anteroposterior do hipocampo (A-F; área em azul) representada como sequência de lâminas do atlas de Paxinos e Watson (1996)

2.5.1 Método Fluoro-Jade

Seguindo o protocolo proposto por Schmued e colaboradores (1997), as lâminas foram submetidas a banhos sucessivos de etanol absoluto durante 3 minutos, etanol 70%, por 1 minuto, água destilada (dH_2O), por mais 1 minuto, permanganato de potássio durante 15 minutos, com agitação branda, 3 lavagens em dH_2O por 1 minuto, 1 banho com Fluoro-Jade (preparado e utilizado no mesmo dia), por 30 minutos, com agitação branda, 3 lavagens em dH_2O por 1 minuto, e secagem das lâminas. Posteriormente, foi utilizado, como meio de montagem, fluoromont e ácido acético (3:1), sendo posto em cada lâmina $150\ \mu\text{L}$ dessa solução. Os cortes foram analisados e as imagens capturadas através de um microscópio de fluorescência (Nikon DS RI1).

2.4.2 Contagem de Células

Em hipocampos que foram submetidos ao SE, foi avaliado o número de células em três regiões hipocâmpais: CA1, CA3 e hilus do giro denteado. Essas regiões foram selecionadas devido à alta sensibilidade ao processo neurodegenerativo. De acordo com Paxinos e Watson (1996), para a quantificação da neurodegeneração foram feitas amostras de até 10 áreas em três diferentes coordenadas do hipocampo, desde o hipocampo ventral até o hipocampo dorsal (AP -2,56mm, AP -3,30mm e AP -6,30mm).

A contagem foi realizada através do programa Image J (NIH, freeware), sendo utilizado o *plugin cell conter*, que permite contar automática ou manualmente células em um determinado campo. Neste caso específico, foi utilizado o método manual de contagem.

2.6 Análises de expressão gênica diferencial

2.6.1 Dissecções dos hipocampos

Após a decapitação dos animais, os hipocampos foram imediatamente dissecados sobre superfície fria e rapidamente congelados em nitrogênio líquido (-180°C). Os tecidos foram mantidos em tubos eppendorf a -80°C até a etapa de processamento.

2.6.2 Extração de RNA total de hipocampo de rato

O RNA total foi isolado utilizando-se o reagente Trizol, de acordo com as recomendações do fabricante (Invitrogen, CA, USA), com modificações.

Os hipocampos esquerdos dos ratos foram transferidos do *freezer* a -80°C para nitrogênio líquido. A cada tubo contendo um hipocampo, foram adicionados 350 µL de trizol, à temperatura ambiente, e os conteúdos foram homogeneizados com pistilos para tubos eppendorf. Em seguida, foram adicionados 140 µL de clorofórmio (proporção de 200 µL de clorofórmio para 1 mL de trizol) e os conteúdos foram homogeneizados por inversão e mantidos à temperatura ambiente, por cerca de 3 minutos. As amostras foram então centrifugadas (Heal Force ® - High speed

refrigerated bench), a 12000g, durante 15 minutos, a 4°C. A fase aquosa dos tubos (fase contendo RNA) foi transferida para tubos novos. O restante do conteúdo, interfase e fase orgânica, foi armazenado em freezer a -80°C. Aos tubos contendo as fases aquosas foram adicionados 175 µL de isopropanol (proporção de 500 µL de isopropanol a cada 1 mL de trizol). As amostras foram mantidas à temperatura ambiente, por 30 minutos, e, em seguida, centrifugadas a 12000g, por 30 minutos, a 4°C. Após essa etapa, o pellet de RNA foi visualizado. O isopropanol foi então removido cuidadosamente por inversão dos tubos e foi adicionado 1 mL de etanol 75%, para lavagem dos pellets, que foram deslocados com auxílio de vórtex. Os conteúdos foram novamente centrifugados a 12000g, por 5 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi então desprezado, preservando-se o pellet. Os pellets foram, em seguida, novamente lavados com 1 mL de etanol 75% e centrifugados a 12000g, por 5 minutos, a 4°C. Após esse processo, os sobrenadantes foram descartados e os tubos foram mantidos invertidos sobre papel absorvente. Os pellets foram ressuspensos em 30 µL de água milliQ tratada com DEPC (Dietilpirocarbonato) e foram incubados por 20 minutos, à temperatura ambiente e durante 40 minutos em gelo para completa dissolução dos pellets. Após esses procedimentos, as amostras foram armazenadas em freezer a -80°C. Todas as soluções foram preparadas com água tratada com DEPC.

2.6.3 Quantificação das amostras de RNA total

A concentração e a pureza dos RNAs foram avaliadas através de espectrofotometria (Espectrofotômetro Eppendorf BioPhotometer Plus). As amostras foram quantificadas a partir da densidade óptica (OD), obtida em comprimento de onda de 260nm. A pureza desses RNAs foi avaliada a partir do cálculo da razão entre os valores de absorbância nos comprimentos de onda 260nm e 280nm.

As tabelas 1, 2, 3 e 4 apresentam a quantidade total de RNA obtido e a razão OD_{260}/OD_{280} das amostras purificadas.

Tabela 3- Concentração e quantidade total de RNA extraído de hipocampus esquerdos dos animais do grupo PILO

Amostra	Razão OD_{260}/OD_{280}	Quantificação de RNA OD_{260} ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Quantidade total de RNA na amostra (μg)
1	2,09	2,38	13,4
2	1,59	3,12	23,5
3	1,63	2,11	21,1
4	1,56	3,08	30,8
5	1,60	4,38	30,1

Fonte: Autora, 2015.

Tabela 4- Concentração e quantidade total de RNA extraído de hipocampus esquerdos dos animais do grupo CETO+PILO

Amostra	Razão OD_{260}/OD_{280}	Quantificação de RNA OD_{260} ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Quantidade total de RNA na amostra (μg)
1	1,68	4,28	30,8
2	1,60	3,16	23,2
3	1,66	4,24	31,1
4	1,47	3,82	29,8
5	1,69	4,24	31,0
6	1,71	3,55	26,1

Fonte: Autora, 2015.

Tabela 5- Concentração e quantidade total de RNA extraído de hipocampus esquerdos dos animais do grupo CETO

Amostra	Razão OD_{260}/OD_{280}	Quantificação de RNA OD_{260} ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Quantidade total de RNA na amostra (μg)
1	1,60	3,19	23,2
2	1,62	3,43	24,7
3	1,64	3,20	23,7
4	1,64	2,66	20,2
5	1,67	3,92	28,9
6	1,74	3,65	26,9

Fonte: Autora, 2015.

Tabela 6- Concentração e quantidade total de RNA extraído de hipocampus esquerdos dos animais do grupo NAIVE

Amostra	Razão OD_{260}/OD_{280}	Quantificação de RNA OD_{260} ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Quantidade total de RNA na amostra (μg)
1	1,71	1,744	52,32
2	1,74	1,88	56,64
3	1,72	2,21	66,48
4	1,72	2,33	70,08
5	1,67	1,39	41,76
6	1,69	1,6	48,00

Fonte: Autora, 2015.

2.7 Experimentos de RT-qPCR

2.7.1 Síntese de DNA complementar (cDNA)

Após a extração do RNA total, as amostras foram tratadas com DNase. Aos volumes das amostras correspondentes a 3 μg de RNA total, foram adicionados tampão de DNase 1x (Ambion), 1U de DNase (Ambion) e 2U de RNaseOUT™ (Invitrogen). As reações foram incubadas a 37°C, por 30 minutos. Foi, então, adicionado EDTA 5 mM e as reações foram incubadas a 75°C, por 10 minutos. Após o tratamento, todas as amostras foram armazenadas a -80°C.

A síntese de cDNA foi realizada utilizando-se o High Capacity® kit (Applied Biosystems), de acordo com as instruções do fabricante. Foram adicionados na reação 2 μL RT Buffer (10x), 0,8 μL de dNTP mix 25x (100Mm), 2 μL de RT Random Primers (10x) e 1 μL de MultiScribe™ Reverse Transcriptase (50U/ μL). A quantidade inicial de RNA utilizada foi de 1 μg . As reações foram incubadas a 25°C, por 10 minutos, 37°C, por 120 min, e 85°C por 5 min. Após a síntese de cDNA, foram adicionados 180 μL de água milliq tratada com DEPC. Todas as amostras foram divididas em quatro alíquotas e armazenadas a -80°C.

2.7.2 Reação de amplificação

Os perfis de expressão foram determinados através da metodologia RT-qPCR. As reações foram realizadas utilizando-se o equipamento StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems).

As reações de RT-qPCR foram realizadas em triplicatas e consistiram em 2,0 µL de cada amostra de cDNA, 6 µL de SYBR® Green PCR Master Mix (Invitrogen), 3 µL de cada primer a uma concentração final específica e 1,0 µL de água, em volume final de 12 µL. As reações de amplificação ocorreram nas seguintes condições: desnaturação a 95 °C, por 10 minutos, e 40 ciclos de amplificação a 95°C, por 15 segundos, e 60°C, por 1 minuto. Ao final, foi realizada uma etapa de dissociação a 95°C, por 15 segundos, 60°C, por 1 minuto e 95°C, por 15 segundos, para geração da curva de dissociação. O número de ciclos de PCR em que a fluorescência atingiu o limiar (threshold) na curva de amplificação – ciclo threshold (CT) – foi determinado automaticamente pelo programa StepOnePlus™ (Applied Biosystems).

Os primers escolhidos, para a realização da expressão relativa, foram GFAP (proteína glial ácida), TNF-α (fator de necrose tumoral). E os primers normalizadores utilizados foram RPLP-1 (proteína ribossomal ácida p1) e β-Actina. As concentrações específicas de cada primer foram determinadas pela reação de amplificação (descrita anteriormente), onde constatou-se que a concentração final a ser utilizadas nas reações seguintes foi de 0,2 MM, de cada primer. A tabela 7 apresenta as sequências dos primers desenhados para os genes de referência selecionados (RPLP-1 e β-Actina) e para o gene GFAP e TNF-α.

Tabela 7- Genes e sequência dos primers desenhados e utilizados no estudo.

Gene	Símbolo*	Sequência dos primers 5'-3'
Beta-actina	Actb	F- ATCTTTCTGGTGCTTGTCTCT R – TGAGGTGGGTGGAAGTGA
Proteína ribossomal, grande, P1	RPLP1	F - GCATCTACTCCGCCCTCA R - ATCTTATCCTCCGTGACCGT
Proteína glial fibrilar ácida	GFAP	F - AACCGCATCACCATTCTGT R – CATCTCCACCGTCTTTACCAC
Fator de necrose tumoral	TNF-α	F-GCTCCCTCTCATCAGTTGCA R-CTCCGCTTGGTGGTTTGCTA

Fonte: RGD (Rat Genome Database)

2.7.3 Determinação da eficiência de amplificação

Para a determinação da eficiência de amplificação, foram geradas as curvas-padrão baseada em 5 pontos de diluição (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32). Para isso, utilizou-se o valor de CT obtido em cada diluição *versus* o log das respectivas diluições. A partir da correlação entre esses dois fatores, as eficiências de amplificação (E) foram determinadas através da fórmula:

$$E = [10^{(-\frac{1}{slope})} - 1] \times 100,$$

Onde *slope* é a inclinação da reta obtida.

A tabela 7 apresenta as eficiências de amplificação para cada gene. Todas as reações apresentaram eficiência dentro do intervalo de 90-110%.

Tabela 8- Eficiência de amplificação das reações de qRT-PCR referentes aos genes analisados

Primer	% de eficiência
GFAP	91,18%
TNF- α	103,03%
RPLP1	95,79%
β -Actina	96,91%

Fonte: Autora, 2015.

2.8 Análise Estatísticas

Os dados foram expressos como valores de média \pm desvio padrão e analisados por Análise de Variância (ANOVA), seguida pelo Teste de Tukey. Quando necessário, fez-se o teste T. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Utilizou-se o pacote estatístico IBM SPSS *Statistics*, versão 21.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.2 Efeito da dieta cetogênica no peso, na ingestão e na eficiência alimentar

Estudo realizado por Rêgo (2011) sugeriu que dieta cetogênica à base de óleo de coco extra-virgem exerceu um efeito protetor sobre as crises convulsivas de ratos portadores de epilepsia induzida por pilocarpina, especialmente sobre a frequência e a duração das crises recorrentes espontâneas, indicando, dessa forma, um benefício potencial do óleo de coco no controle das crises epiléticas, indicando uma nova alternativa terapêutica para indivíduos portadores de epilepsia resistente à terapia medicamentosa.

Gama *et al.* (2015) utilizando as mesmas condições experimentais que o estudo de Rêgo (2011), no entanto com outra fonte de TCM (trianantina) e investigando somente o *Status Epilepticus*, demonstraram que a DC rica em TCM promoveu o aumento na frequência de crises antes do estabelecimento do *SE* podendo indicar maior resistência do animal em desenvolver o *SE*

Ainda investigando o uso fontes de TCM (trianantina), em proporções cetogênicas, no contexto da depressão alastrante, observou que está dieta promove diminuição da excitabilidade cerebral, reduzindo, de forma acentuada, a velocidade de propagação, em córtex cerebral de ratos (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

Todos esses achados têm incentivado cada vez mais o avanço de pesquisas visando estabelecer clinicamente o uso da dieta cetogênica, em particular rica em TCM, como o óleo de coco e a trienantina, sobretudo no contexto da epilepsia farmacorresistente.

Inicialmente, comparou-se os animais submetidos a DC com os submetidos a dieta padrão com base nos seguintes parâmetros: ganho de peso total, ingestão total, ingestão total de energia e coeficiente alimentar (tabela 8). Em relação a esses parâmetros, observou-se diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos experimentais.

Tabela 9- Ganho de peso total, ingestão total, ingestão total de energia e coeficiente de eficiência alimentar (CEA) dos animais distribuídos nos grupos Controle e Cetogênico, em 30-32 dias de tratamento dietético.

Variáveis	Grupos de animais	
	PILO (n= 15)	CETOGÊNICO (n=35)
Ganho de peso total (g)	132,87 ± 13,90	118,64 ± 16,65*
Ingestão total (g)	637,39 ± 83,92	271,90 ± 27,27**
Ingestão total de energia (kcal)	2513,63 ± 330,94	1906,76 ± 36,37**
CEA	21,21 ± 3,84	44,08 ± 6,89**

Os dados foram submetidos ao teste T; Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes, * $p < 0,05$ e ** $p < 0,0001$. Fonte: Autora, 2015.

Os grupos cetogênicos tiveram menor ganho de peso em relação ao grupo PILO ($p = 0,006$). De fato, a DC promove o menor ganho de peso, devido a sua característica termogênica, uma maior eficiência termogênica, resulta em maior gasto energético. Este dado está em concordância com outros estudos experimentais (JEONG *et al.*, 2010 e GAMA *et al.*, 2014), como também já foi evidenciado em uma recente meta-análise que envolveu a utilização da DC e redução de peso em ensaios clínicos (BUENO *et al.*, 2013).

Observou-se também que os animais do grupo cetogênico consumiram quantidade de dieta menor do que o grupo PILO ($p < 0,0001$). A DC possui uma maior densidade energética levando os animais a compensarem tal diferença com uma menor ingestão de alimentos para atender as demandas fisiológicas (GAMA *et al.*, 2014), como também pode ser explicado devido ao maior poder de saciedade que as DCs apresentam em comparação com as dietas padrão para roedores.

Quanto à ingestão total de energia, os resultados foram similares aos de ganho de peso, ou seja, o grupo cetogênico apresentou menor consumo calórico em relação ao grupo PILO, constatando o efeito termogênico que o óleo de coco apresenta, um vez, que os animais cetogênicos apresentaram perda de peso e redução na ingestão calórica total, esta última variável pode ser afetada também devido a menor palatibilidade que as DCs apresentam.

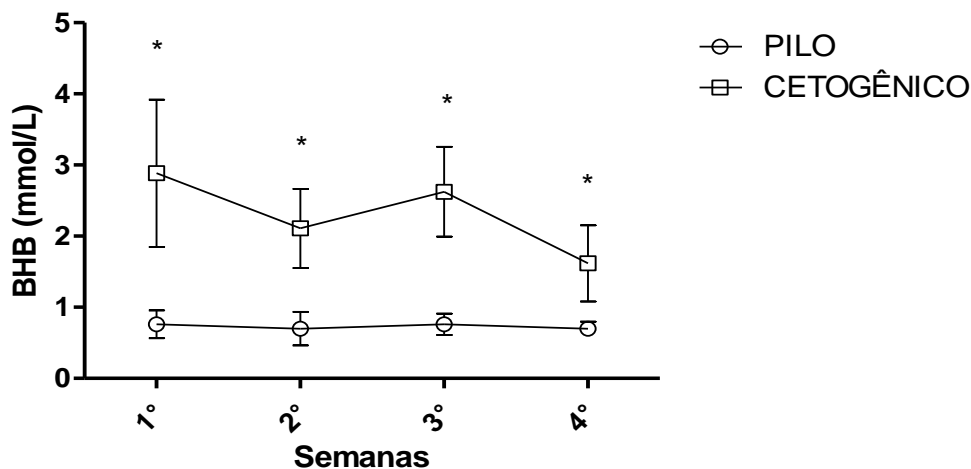
No que se refere ao CEA, observou-se que os animais do grupo PILO apresentaram um valor inferior ao grupo cetogênico ($p < 0,0001$), indicando que a DC não interfere no desenvolvimento ponderal dos animais.

Seguindo nosso desenho experimental, quando os animais tratados com a DC foram subdivididos aleatoriamente nos grupos CETO+PILO ($n=17$), e grupo CETO ($n=18$), as análises estatísticas foram repetidas entre esses grupos. Observou-se que os animais de ambos os grupos não apresentaram diferença significativa de ganho de peso total, ingestão total, ingestão total de energia e CEA (dado não mostrado).

3.3 Cetonemia

Avaliaram-se os níveis sanguíneos de corpos cetônicos, ao final de cada semana de tratamento dietético. Os animais mantidos em DC (grupo CETO+PILO e CETO) exibiram marcadamente maiores níveis de cetonemia ao longo das 4 semanas de tratamento, em comparação com os animais alimentados com uma dieta normal para roedores (grupo PILO) (Figura 2). Estes achados corroboram com outros estudos que utilizaram tempo de tratamento cetogênico por 4 semanas (NOH *et al.*, 2006a; LIAN; KHAN; STRINGER, 2007; KWON *et al.*, 2008; JEONG *et al.*, 2010).

Figura 2- Níveis de β -hidroxibutirato semanalmente dos animais dos grupos PILO e CETOGENICO



Os dados foram submetidos ao teste T. Valores de p: 1ª semana: $p < 0,0001$; 2ª semana: $p < 0,0001$; 3ª semana: $p < 0,0001$; 4ª semana: $p = 0,005$; Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significante. Fonte: Autora, 2015.

3.4 Análise comportamental

Para investigar um possível efeito anticonvulsivante da DC, foi realizada uma análise comportamental durante o período de SE, utilizando-se 5 parâmetros. Os dados obtidos estão representados na Tabela 8. Observou-se que para todas as variáveis estudadas, não houve diferença significativa entre os animais submetidos ao pré-tratamento com DC e animais sob dieta padrão para roedores.

Considerando a análise da variável latência para o início do SE não houve diferença significativa entre os grupos experimentais. Nossos achados são comparáveis aos de Lian, Khan e Striger (2007), que utilizaram o mesmo paradigma experimental, ou seja, um pré-tratamento com DC por 4 semanas em animais com mais de 30 dias de idade e SE induzido através de pilocarpina. Outros autores também observaram resultados similares utilizando delineamento experimental diferente, com duração do pré-tratamento cetogênico inferior a 4 semanas e indução do SE através de cainato (BOUGH et al., 2002; SAMALA, WILLIS e BORGES, 2008) ou pilocarpina (GAMA et al., 2014).

Por outro lado, a maioria dos estudos mostraram um aumento no tempo de latência, sugerindo que a DC retarda o estabelecimento do SE (NOH et al., 2003; NOH et al., 2005a; NOH et al., 2005b; NOH et al., 2006a; NOH et al., 2006b; JEON et al., 2009; LUAN et al., 2012; KOBOW et al., 2013; KRESYUN et al., 2013;). De fato, esses estudos que mostraram um efeito da DC na latência para o SE iniciaram o tratamento com animais em idade igual ou inferior a 21 dias, enquanto em nosso estudo, os animais apresentavam idade de 30 dias. Os estudos que não mostraram efeito da DC nesses parâmetros, mesmo utilizando animais com idade igual ou inferior a 21 dias, foram desenvolvidos com base em tempo de tratamento com DC inferior a 4 semanas.

Essas divergências podem ser explicadas por particularidades no delineamento experimental, como por exemplo a idade dos animais no início do tratamento e/ou o tempo de tratamento, assim como pela composição lipídica das DCs utilizadas. Particularmente, sobre o tipo de gordura utilizada na composição das DCs pode-se observar que somente um estudo utilizou fonte de TCM (GAMA et al., 2014) para compor a DC, mesmo fonte utilizada em nosso estudo, e nas mesmas proporções. Os demais estudos utilizaram fonte lipídica a base de TCL, nas proporções de 4:1 ou de 6:1, por tanto estas diferenças tanto da característica da

gordura utilizada, como da proporção entre lipídeos e proteína + carboidratos, não é parâmetro suficiente para sugerir diferenças significantes. Assim, uma análise crítica dos dados disponíveis sugerem que o efeito da DC em aumentar a latência para o SE apresenta uma correlação com um tratamento igual ou superior a 4 semanas utilizado em animais de idade igual ou inferior a 21 dias. Novos estudos fazem-se necessário para a confirmação desta hipótese e mecanismos associados.

Tabela 10- Análise comportamental dos animais distribuídos nos grupos PILO E CETO + PILO, em 30-32 dias de tratamento cetogênico

Variáveis	Grupos de animais		Valor de p
	PILO (n=15)	CETO+PILO (n=16)	
Latência da primeira crise (seg.)	152 ± 82	223 ± 190	0,19
Latência do SE (seg.)	1106 ± 447	855 ± 394	0,10
Número de crises antes do SE	20,33 ± 10,32	13,87 ± 7,80	0,06
Frequência de crises de nível 5 durante o SE	21,53 ± 24,54	26,81 ± 24,07	0,55
Número de dose de Diazepam para a reversão do SE	3,87 ± 1,35	4,00 ± 0,894	0,74

Média ± desvio-padrão; * Segundo a escala de Racine (1972) modificada; Teste T, Valores de p ≤ 0,05 foram considerados estatisticamente significante
Fonte: Autora, 2015.

Em relação a variável número de crises antes do estabelecimento do SE é interessante notar que se observou uma forte tendência de diferença estatística entre os grupos. Os grupos cetogênicos apresentaram um menor número de crise antes do SE ($p=0,06$). O fato desta diferença não ter sido significativa pode ser devido ao desvio muito grande entre os valores obtidos no grupo PILO.

Em relação ao efeito da DC na diminuição das crises antes do SE, o único estudo que avaliou esta variável mostrou que os animais submetidos a DC apresentaram maior frequência dessas crises (GAMA et al., 2014). Uma explicação para essa divergência pode ser a duração do tratamento cetogênico que no estudo de Gama e colaboradores (2014) foi inferior a 4 semanas.

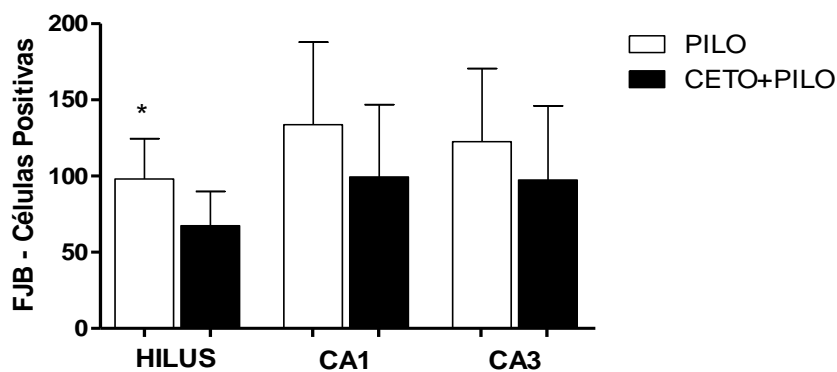
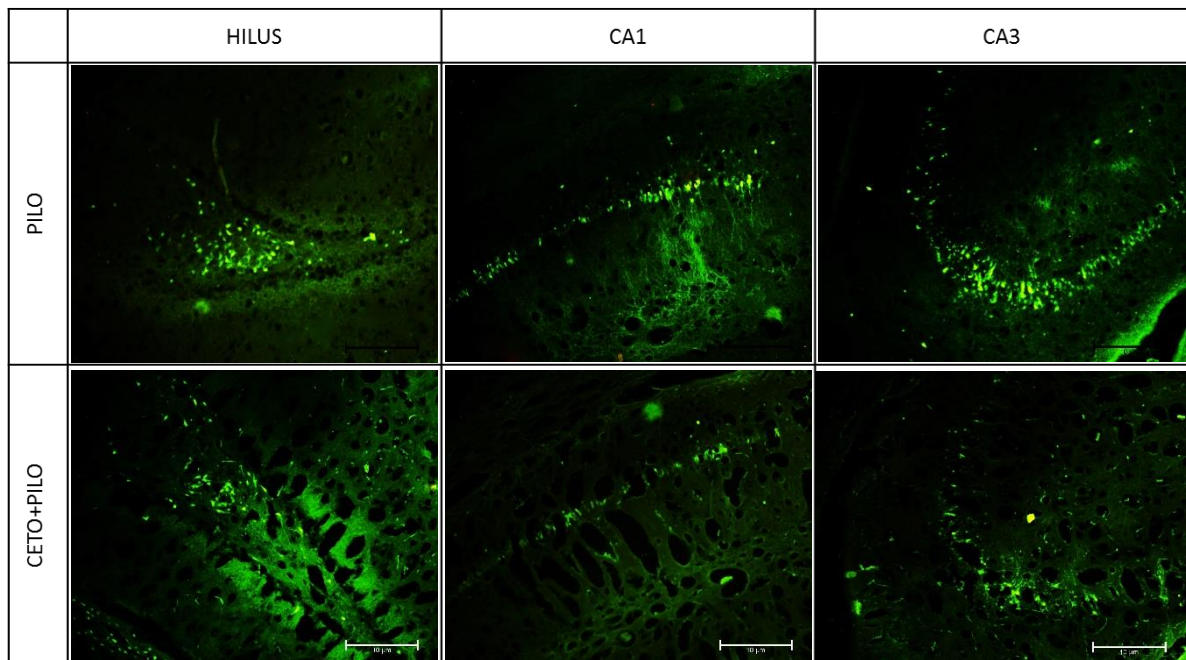
No que se refere a latência para a primeira crise antes do SE, frequência das crises de nível 5 durante o SE e número de doses de diazepam necessárias para abortar o SE, a discussão da ausência de efeito da DC é limitada pois nenhum estudo foi encontrado na literatura que abordasse essas variáveis no contexto de tratamento cetogênico de epilepsia.

3.5 Análise Histoquímica

A investigação do potencial efeito neuroprotetor da DC foi feita através de histoquímica, utilizando-se a técnica de marcação com Fluoro-Jade que apresenta especificidade para células mortas ou em processo de morte. As contagens foram feitas em diferentes áreas (CA1, CA3 e hilus) e profundidades (dorsal, medial e ventral) do hipocampo. Para a análise quantitativa, os dados obtidos em diferentes profundidades foram somados, obtendo-se, assim, o padrão de marcação total das sub-regiões CA1, CA3 e hilus. De uma forma geral, observou-se que em todas as regiões do hipocampo analisadas (CA1, CA3 e hilus), o grupo CETO+PILO obteve menor contagem de células positiva para FJ (Figuras 4). Entretanto, quando os grupos foram comparados entre si, somente a região do hilus indicou, menor contagem de células positivas, conferindo-se em diferença significativa em comparação ao grupo PILO. De fato, a estrutura mais danificada na epilepsia do lobo temporal é o hipocampo, que exibe uma perda neuronal seletiva (MCNAMARA, 1994). Observando alguns achados experimentais, as células do hilus são uma das primeiras populações neuronais do hipocampo a morrer (BUCKMASTER e DUDEK, 1997; NISSINEN, LUKASIUK e PITKÄNEN, 2001), o que pode estar relacionado

com a extensão do brotamento das fibras musgosas. Talvez essa menor mortalidade no hilus, observada em nossos achados, pudesse promover menos brotamento de fibras musgosas e com isso menos rearranjos sinápticos aberrantes, o que poderia favorecer a diminuição na frequência das crises recorrentes e espontâneas.

Figura 3- Análise da neurodegeneração FJ+ nas regiões Hilus, CA1 e CA3 do hipocampo dos animais do Grupo PILO e DC+PILO 24 horas após SE.



Contagem de células em degeneração dos grupos. Os dados foram submetidos ao teste T. Média \pm desvio-padrão dos grupos **PILO** (n=5) e **CETO+PILO** (n=6), nas regiões **hilus** ($98,06 \pm 19,64$ e $67,47 \pm 6,21$, $p=0,009$ respectivamente), **CA1** ($122,5 \pm 42,72$ e $97,40 \pm 29,7$, $p=0,29$, respectivamente) e **CA3** ($133,8 \pm 45,67$ e $99,40 \pm 32,91$, $p=0,19$, respectivamente). Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados diferentemente significantes. Fonte: Autora, 2015.

Apenas dois estudos utilizaram o método de fluore-jade para analisar a morte neuronal decorrente de tratamento cetogênico. Jeon e colaboradores (2009) observaram que a DC diminui a morte neuronal, na área CA3, de forma

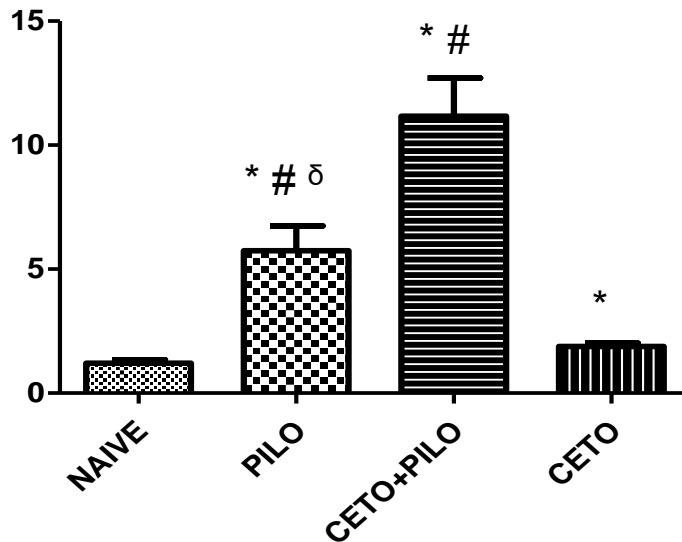
significante, após um pré-tratamento de 6 semanas antes do SE. Entretanto, Samala, Willis e Borges (2008), não encontraram diferença significativa na contagem de células positiva para FJ no hipocampo de animais alimentados com DC durante pré-tratamento de 16 dias. Nossos dados corroboram com os resultados observados no estudo de Jeon e colaboradores (2009), sugerindo que a ausência de efeito no estudo de Salama, Willis e Borges (2008) possa ser decorrente do tempo muito curto de pré-tratamento. De fato, alguns estudos analisaram o efeito da DC na neurodegeneração, utilizando métodos que não o Floure-Jade. Dentre os cinco estudos que utilizaram o mesmo paradigma experimental que o nosso (pré-tratamento de 4 semanas) (NOH *et al.*, 2003; NOH *et al.*, 2005a; NOH *et al.*, 2005b; NOH *et al.*, 2006a; KWON *et al.*, 2008), quatro estudos mostraram efeito neuroprotetor da DC. Um único estudo não observou um efeito, provavelmente devido ao método de avaliação que foi utilizado para a análise de morte neuronal (imunohistoquímica através de NeuN) (KWON *et al.*, 2008).

3.4.1 Análise do efeito da DC no processo de astrogliose durante a fase aguda da epileptogênese

A investigação do potencial efeito da DC na proliferação astrocística foi feita através da análise dos níveis de expressão de Proteína Glial Ácida (GFAP), no hipocampo esquerdo utilizando-se a técnica de RT-qPCR. A proteína GFAP foi selecionada para esta análise, uma vez que é expressa de maneira específica em astrócitos e tem sido utilizada como marcador de astrogliose durante o processo epileptogênico (ROMCY-PEREIRA, 2008).

Na figura 5 pode-se observar os níveis relativos de transcritos GFAP no hipocampo dos animais dos diferentes grupos experimentais (NAIVE, PILO, CETO+PILO e CETO). A análise estatística mostrou que os níveis de GFAP são maiores nos grupos Ceto-PILO e PILO, quando comparados com os animais do grupo NAIVE ($p < 0,001$ e $p = 0,001$, respectivamente) e CETO ($p < 0,001$ e $p = 0,002$, respectivamente). Este aumento está relacionado ao SE, uma vez que a literatura tem mostrado de forma consistente o aumento dos níveis de GFAP 24 horas após o SE (BORGES *et al.*, 2003; ROSSI *et al.*, 2013; ZANG *et al.*, 2015).

Figura 4- Expressão relativa de GFAP por RT-qPCR nos animais dos grupos NAIVE, PILO, CETO+PILO E CETO



Os dados foram submetidos a ANOVA seguido de post-hoc Tukey. Média \pm desvio-padrão dos grupos Naive ($1,20 \pm 0,35$, $n=5$), CETO ($1,88 \pm 0,33$, $n=6$), PILO ($5,73 \pm 2,25$, $n=6$) e CETO+PILO ($11,16 \pm 3,77$, $n=6$). Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados diferentes significativamente. Diferença significativa: (*) em relação ao grupo Naive, (#) em relação ao grupo CETO e (ø) em relação ao grupo CETO+PILO. Fonte: Autora, 2015.

Observam-se, também, níveis maiores de GFAP no grupo CETO+PILO, quando comparado com o grupo PILO ($p=0,02$), e no grupo CETO, quando comparado com o grupo NAIVE ($p= 0,006$). Estes dados indicam que DC, *per se*, induz um aumento nos níveis de GFAP, tanto em animais submetidos ao SE, quanto em animais que receberam a DC mas que não foram induzidos ao SE. Utilizando animais naives, Silva e colaboradores (2005) analisaram a astrogliose por meio da detecção de GFAP, pelo método de ELISA. Os autores observaram uma maior quantidade desta proteína na região CA3 de animais normais alimentados com DC, por uma semana, mas, essa diferença significativa desapareceu quando o tratamento cetogênico se estendeu por mais 6 semanas.

Um único estudo avaliou o efeito da DC nos níveis de GFAP em hipocampus de animais submetidos ao SE, após um período de pre-tratamento por 4 semanas. Os autores não observaram aumento de GFAP em células co-localizadas com BrdU, com o objetivo de avaliar que tipo de célula estava em proliferação pós-SE, utilizando o método de imunohistoquímica para detecção de GFAP (KWON et al., 2009).

Apesar da presença efetiva da astrogliose no processo epileptogênico, ainda se desconhece o seu papel (astrogliose) na gênese e/ou na progressão da epilepsia. É possível sugerir que a astrogliose altere a excitabilidade hipocampal (GUEDES, GALVIS-ALONSO e LEITE, 2006).

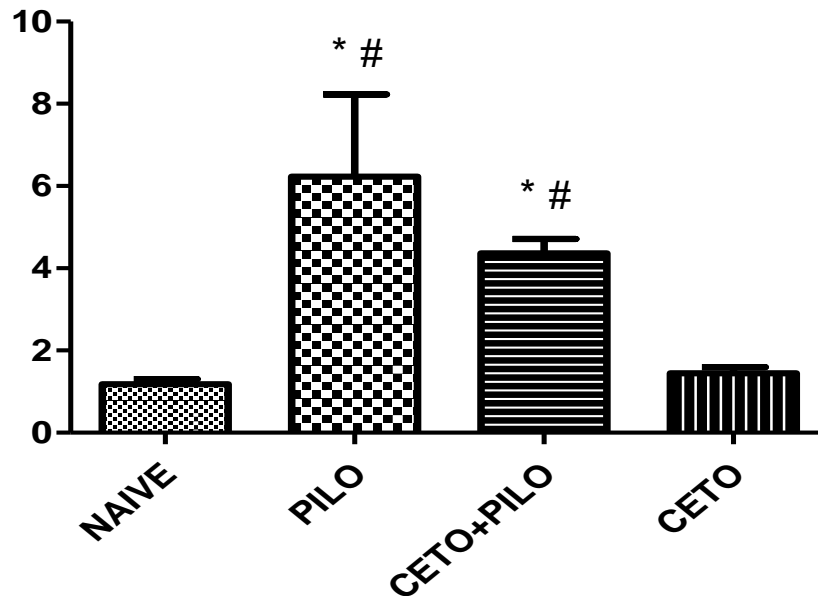
3.4.2 Análise do efeito da DC no processo inflamatório durante a fase aguda da epileptogênese

Para investigar o potencial efeito da DC no processo inflamatório, foi feita a análise dos níveis de expressão do Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- α), no hipocampo esquerdo utilizando-se a técnica de qRT-PCR. O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória envolvida no desencadeamento da resposta inflamatória e apresenta uma relação positiva no desenvolvimento das convulsões (BOLOSSO *et al.*, 2005).

Na figura 6, pode-se observar a quantificação de TNF- α , no hipocampo dos animais dos grupos experimentais, PILO, CETO+PILO, CETO e NAIVE. Através da análise estatística, observou-se que os grupos PILO e CETO+PILO apresentaram níveis significativamente maiores de TNF- α quando comparados com os grupos NAIVE ($p=0,02$ e $p<0,001$, respectivamente) e CETO ($p<0,001$ e $p=0,02$, respectivamente). Este aumento nos níveis deve ser devido ao SE, uma vez que a literatura consistentemente tem mostrado uma superexpressão de TNF- α na fase aguda da epileptogênese, em modelos de SE induzido através de pilocarpina (ARISI *et al.*, 2015; WANG, *et al.*, 2015) e de cainato (SU *et al.*, 2015; LEE *et al.*, 2008). Quando se comparam os níveis de expressão de TNF- α dos grupos CETO+PILO e PILO, não se observa uma diferença significativa. O mesmo acontece quando a comparação é feita entre os grupos naive e CETO. Estes dados indicam que a DC não modula a expressão de TNF- α tanto em animais submetidos a SE, quanto em animais naives.

Jeong *et al.* (2011) também não verificaram efeito modulador da DC na expressão de TNF- α 6 horas após o SE, embora tenha sido observada uma atenuação da expressão 2 horas após o SE, em comparação com o grupo que não recebeu o tratamento com DC.

Figura 5- Expressão relativa de TNF- α por RT-qPCR nos animais dos grupos NAIVE, PILO, CETO+PILO E CETO.



Os dados foram submetidos à ANOVA seguida de post-hoc Tukey. Média \pm desvio-padrão dos grupos NAIVE (1,17 \pm 0,30, n=6), CETO (1,44 \pm 0,35, n=6), PILO (6,22 \pm 4,46, n=5) e CETO+PILO (4,36 \pm 0,86, n=6). Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados diferentes significativamente. Diferença significativa: (*) em relação ao grupo Naive, (#) em relação ao grupo CETO. Fonte: Autora (2015)

Considerando os presentes dados da literatura, pode-se sugerir que a DC consegue minimizar os efeitos inflamatórios, através de uma diminuição na expressão de TNF- α somente nas primeiras horas pós-SE, no período agudo inicial da epileptogênese. Entretanto, este efeito anti-inflamatório desaparece horas depois, ainda na fase aguda da epileptogênese. No entanto, mais estudos que utilizem os mesmos parâmetros metodológicos são necessários, na tentativa de estabelecer uma maior compreensão dos efeitos da DC na neuroinflamação característica do processo epileptogênico.

4 CONCLUSÃO

Os dados de ganho ponderal, ingestão alimentar e energética e de coeficiente de eficiência alimentar revelam as características metabólicas do óleo de coco, demonstrando o seu potencial termogênico.

Os resultados comportamentais não apresentarem efeito significantes em relação ao uso da DC. É importante ressaltar que o *SE* é um evento agressivo e muito robusto, difícil de ser atenuado.

Quanto à análise histológica, observou-se que a DC minimizou a morte neuronal no hilus, um importante achado, que pode contribuir na diminuição dos rearranjos aberrantes e, por conseguinte, atenuar a frequência das crises recorrentes.

Em relação aos dados de expressão gênica, constatou-se que a DC, *per se*, modula positivamente a expressão de GFAP, tanto no processo epileptogênico quanto em condições normais. Quanto a expressão TNF- α , observou-se que a DC atenuou sua expressão, apesar de não apresentar diferença estatística em relação ao grupo que não recebeu o tratamento cetogênico.

Diante do exposto, estudos adicionais, que utilizem as mesmas perspectivas do presente trabalho, devem ser realizados de forma a contribuir para a compreensão dos mecanismos de ação da DC e aumentar as evidências, na tentativa de reforçar os argumentos a favor do efeito anticonvulsivante e neuroprotetor das dietas cetogênicas no contexto da epilepsia.

5 REFERÊNCIAS

- ANDRADE-VALENÇA, L. P. A. et al. Epilepsia do lobo temporal mesial associada à esclerose hipocampal. **Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiol.** v. 12, n. 1, p. 31-36, 2006;
- ARISI, G. M. et al. Increased CCL2, CCL3, CCL5, and IL-1 β cytokine concentration in piriform cortex, hippocampus, and neocortex after pilocarpine-induced seizures. **Journal of Neuroinflammation.** v.12, p.1-7, 2015;
- BOUGH, K.J. et al. An anticonvulsant profile of the ketogenic diet in the rat. **Epilepsy Research.** v. 50, p. 313-325, 2002;
- BOLOSSO, S. et al. Tumor necrosis factor- α inhibits seizures in mice via p75 receptors. **Annals of Neurology.** v. 57, p. 804–812, 2005;
- BORGES, K. et al. Neuronal and glial pathological changes during epileptogenesis in the mouse pilocarpine model. **Experimental Neurology.** v. 182, p. 21–34, 2003;
- BUCKMASTER, P. S.; DUDEK, F. E. Network properties of the dentate gyrus in epileptic rats with hilar neuron loss and granule cell axon reorganization. **Journal of Neurophysiology.** v. 77, n. 5, p. 2685-2696, 1997;
- CAPPOLA, G. et al. Ketogenic diet for the treatment of catastrophic epileptic encephalopathies in childhood. **European journal of pediatric neurology.** v.14, p. 229–234, 2010;
- CARABALLO, R. et al. Long-term follow-up of the ketogenic diet for refractory epilepsy: multicenter Argentinean experience in 216 pediatric patients. **Seizure.** n.8, p. 640-5, 2011;
- CHINESE MEDICAL ASSOCIATION. Prospective multicenter study on long-term ketogenic diet therapy for intractable childhood epilepsy. **Zhonghua Er Ke Za Zhi.**v.51, n. 4, p. 276-82, 2013.
- DRESSER, A. et al. Long-term outcome and tolerability of the ketogenic diet in drug-resistant childhood epilepsy--the Austrian experience. **Seizure.** v.19, n.7, p. 404-8, 2010;
- ENGEL, J. et al. Mesial temporal lobe epilepsy. In Engel J Jr, Pedley TA (Eds). *Epilepsy: a comprehensive textbook.* Philadelphia: Lippincott-Raven. p. 2417-2426, 1997;
- ENGEL, J. Jr. Intractable epilepsy: definition and neurobiology. **Epilepsia.** Suppl. 42, p. 6:3, 2001;
- GAMA, I.R. et al. Effects of ketogenic diets on the occurrence of pilocarpine-induced status epilepticus of rats. **Metab Brain Dis.** v. 30, n. 1, p. 93-98, 2014;

GASTAUT H, *et al.* Relative frequency of different types of epilepsy. A study employing the classification of the International League Against Epilepsy. **Epilepsia**. n. 16, p. 457–461, 1975.

INTERNATIONAL LEAGUE AGAINST EPILEPSY (ILEAE). Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. **Epilepsia**. n. 30, p.389–399, 1989;

JEON, B. T. *et al.* Ketogenic diet attenuates kainic acid-induced hippocampal cell death by decreasing AMPK/ACC pathway activity and HSP70. **Neurosci Lett**. v. 453, n. 1, p.49-53, 2009;

JEONG, H. J. *et al.* The ketogenic diet suppresses the cathepsin E expression induced by kainic acid in the rat brain. **Yonsei Med J**. v. 51, n. 5, p. 653-60, 2010;

LI, B.M. *et al.* Influence of ketogenic diet on the clinical effects and electroencephalogram features in 31 children with pharmaco-resistant epileptic encephalopathy. **Zhonghua Er Ke Za Zhi**. v.51, n. 5, p. 362-6, 2013;

LI, D. F. *et al.* Effect of fat sources and combinations on starter pig performance, nutrient digestibility and intestinal morphology. **American Association for Laboratory Animal Science**. v. 68, p. 3694-3704, 1990;

LIAN, X. Y.; KHAN, F. A.; STRINGER, J. L. Fructose-1,6-bisphosphate has anticonvulsant activity in models of acute seizures in adult rats. **J Neurosci**. v. 31, n. 27, p. 44, 2007;

LINARD, B. *et al.* Ketogenic diet exhibits neuroprotective effects in hippocampus but fails to prevent epileptogenesis in the lithium-pilocarpine model of mesial temporal lobe epilepsy in adult rats. **Epilepsia**. v. 51, n. 9, p. 1829-36, 2010;

LOWENSTEIN, D.H.; ALLDREDGE, B.K. Status epilepticus. **N Engl J Med**. v. 338, n. 14, p 970-6, 1998;

LUAN G. *et al.* Ketogenic diet reduces Smac/Diablo and cytochrome c release and attenuates neuronal death in a mouse model of limbic epilepsy. **Brain Res Bull**. v. 89, n. 3-4, p. 79-85, 2012;

LUCENA, A. L. M. *et al.* High-fat diet based on trienantin has no adverse metabolic effects in rats. **European Journal of Lipid Science and Technology**. v. 112, p.166–172, 2010.

YUDKOFF, M. *et al.* The ketogenic diet and brain metabolism of amino acids: relationship to the anticonvulsant effect. **Annual Review of Nutrition**. v. 27, p. 415-430, 2007;

KOBOW, K. *et al.* Deep sequencing reveals increased DNA methylation in chronic rat epilepsy. **Acta Neuropathol**. v.126, p.741–756, 2013;

KOSSOFF, E. H. *et al.* Optimal clinical management of children receiving the ketogenic diet: Recommendations of the International Ketogenic Diet Study Group. **Epilepsia**. v. 50, n. 2, p. 304-317, 2008

KRESYUN, V. I. *et al.* Changes in brain cortex sensitivity to epileptogens under conditions of ketogenic diet. **Bull Exp Biol Med**. v. 54, n. 4, p. 457-9, 2013;

KWON, Y. S. *et al.* Effects of the keto.genic diet on neurogenesis after kainic acid-induced seizures in mice. **Epilepsy Res**. v. 78, n. 2-3, p. 186-94, 2008;

MCNAMARA, J.O. Cellular and Molecular Basis of Epilepsy. **The Journal of Neuroscience**. v. 14, n. 6, p. 3413-3425, 1994;

MATHERN, G.W. The pathogenic and progressive features of chronic human hippocampal epilepsy. **Epilepsy Res**. v. 26, n. 1, p. 151-61, 1996;

NEAL, E. G. *et al.* A randomized trial of classical and medium-chain triglyceride ketogenic diets in the treatment of childhood epilepsy. **The lancet neurology**. v. 7, p. 500-506, 2008;

NEVIN, K. G.; RAJAMOHAN, T. Beneficial effects of virgin coconut oil on lipid parameters and in vitro LDL oxidation. **Clinical Biochemistry**. v. 37, p. 830-835, 2004;

NISSINEN, J; LUKASIUK, K.; PITKÄNEN, A. Is mossy fiber sprouting present at the time of the first spontaneous seizures in rat experimental temporal lobe epilepsy? **Hippocampus**. v.11, p. 299 –310, 2001;

NOH, H. S. *et al.* The protective effect of a ketogenic diet on kainic acid-induced hippocampal cell death in the male ICR mice. **Epilepsy Res**. n. 53, p.1-2, 2003;

NOH, H. S. *et al.* Ketogenic diet increases calbindin-D28k in the hippocampi of male ICR mice with kainic acid seizures. **Epilepsy Res**. v. 65, n. 3, p.153-9, 2005a.

NOH, H. S. *et al.* Ketogenic diet prevents clusterin accumulation induced by kainic acid in the hippocampus of male ICR mice. **Brain Res**. v. 1042, n.1, p.114-8, 2005b.

NOH, H. S. *et al.* Ketogenic Diet Protects the Hippocampus From Kainic Acid Toxicity by Inhibiting the Dissociation of Bad From 14-3-3. **J Neurosci Res**. v. 84, n.8, p.1829-36, 2006a;

NOH, H. S. *et al.* Ketogenic diet decreases the level of proenkephalin mRNA induced by kainic acid in the mouse hippocampus. **Neurosci Lett**. v. 395, n.1, p. 87-92. 2006b;

NONINO-BORGES, C. B. *et al.* The ketogenic diet on the tratment of drug resistant epilepsies. **Rev. Nutr**. v.17, n. 4, p. 515 – 521, 2004;

PAXINOS G., WATSON C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinate, Compact **Third Edition**. New York: Academic Press, 1996;

- RACINE, R. J. Modification of seizure activity by electrical stimulation: II. Motor seizure. ***Electroencephalography and Clinical Neurophysiology***. v. 32, p. 281 – 294, 1972;
- REEVES, P. G. Components of the AIN-93 Diets as Improvements in the AIN-76A Diet. ***J. Nutr.*** v. 127, p. 838 – 841, 1997;
- ROMCY-PEREIRA, R. N. *et al.* Genes e epilepsia II: expressão gênica diferencial. ***Rev. Assoc. Med. Bras.*** v.54, n.5, p. 461-466, 2008;
- ROSSI, A.R. *et al.* Gabapentin Administration Reduces Reactive Gliosis and Neurodegeneration after Pilocarpine-Induced Status Epilepticus. ***PLoS ONE***. v. 8, n. 11, p. e78516, 2013;
- SAMALA, R; WILLIS, S.; BORGES, k. Anticonvulsant profile of a balanced ketogenic diet in acute mouse seizure models. ***Epilepsy Res.*** v. 81, n. 2-3, p.119-27, 2008;
- SCHMUED, L. C. *et al.* Fluoro-Jade: a novel fluorochrome for the sensitive and reliable histochemical localization of neuronal degeneration. ***Brain Research***. n. 751, p.37—46, 1997;
- SILVA, M. C. *et al.* Transitory gliosis in the CA3 hippocampal region in rats fed on a ketogenic diet. ***Nutritional Neuroscience***, v. 8, n. 4, p. 259–264, 2005;
- SHARMA, A. K. Mesial Temporal Lobe Epilepsy: Pathogenesis, Induced Rodent Models and Lesions. ***Toxicol Pathol***, n. 35, p. 984-99, 2007;
- SHORVON, S. The outcome of tonic-clonic status epilepticus. ***Curr Opin Neurol.*** v. 7, n. 2, p. 93-5, 1994;
- SU, J. *et al.* Role for pro-inflammatory cytokines in regulating expression of gaba transporter type 1 and 3 in specific brain regions of kainic acid-induced status epilepticus. ***Neurochem Res.*** v. 40, p. 621–627, 2015;
- SU, W. S. *et al.* Timing of ketogenic diet initiation in an experimental epilepsy model. ***Developmental Brain Research.*** v. 125, p.131–138, 2000;
- SUO, C. *et al.* Efficacy and safety of the ketogenic diet in Chinese children. ***Seizure.*** v. 22, n. 3, p. 174-8, 2013;
- THIELE, E.A. Assessing the efficacy of antiepileptic treatments: the ketogenic diet. ***Epilepsia.*** v.44, p.26–29, 2003.
- VAMECQ, J. *et al.* Antiepileptic popular ketogenic diet emerging twists in na ancient story. ***Prog Neurobiol.*** v. 75, p.1–28, 2005;
- VILLENEUVE, N. *et al.* The ketogenic diet improves recently worsened focal epilepsy. ***Dev Med Child Neurol.*** v. 51, n. 4, p.276-81, 2009;

WANG, N. *et al.* Minocycline inhibits brain inflammation and attenuates spontaneous recurrent seizures following pilocarpine-induced status epilepticus. **Neuroscience**. v. 287, p. 144–156, 2015;

XU, X.; SUM, R; JIM, R. Effect of ketogenic diet on hippocampus mossy fiber sprouting and GluR5 expression in kainic acid induced rat model. *Chin Med J (Engl)*. v. 20,n. 119, p. 22, 2006;

XU, X.; SUM, R; JIM, R. The effect of the ketogenic diet on hippocampal GluR5 and Glu(6 mRNA expression and Q/R site editing in the kainate-induced epilepsy model. **Epilepsy Behav**. v. 13, n. 3, p. 445-8, 2008;

ZANG, L. *et al.* FDG-PET and NeuN-GFAP Immunohistochemistry of Hippocampus at Different Phases of the Pilocarpine Model of Temporal Lobe Epilepsy. **International Journal of Medical Sciences**. v. 12, n. 3, p. 288-294, 2015;

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Inúmeras evidências em modelos animais têm demonstrado que uso da dieta cetogênica possui propriedade anticonvulsivantes e neuroprotetoras. A utilização de fontes lipídicas distintas, em particular aquelas ricas em TCM, como o óleo de coco, visa ampliar o cenário de alternativas eficazes para o controle das crises epiléticas, aumentando a qualidade de vida dos indivíduos acometidos por essa patologia.

Neste estudo, os achados em modelos experimentais de epilepsia do lobo temporal foram extraídos a partir de uma revisão sistemática, que demonstraram os benefícios do uso da dieta cetogênica; grande parte desses estudos ressaltam a ação anticonvulsivante e neuroprotetora dessa terapêutica. No entanto, devido à grande heterogeneidade dos estudos, torna-se difícil enfatizar as evidências de forma conjunta e ainda estabelecer critérios de uso, como o início e a duração do tratamento cetogênico. Faz-se necessária a exploração de estudos com metodologias mais homogêneas, que abordem a mesma forma de indução e análises comportamentais similares, por exemplo.

O estudo experimental não demonstrou ação anticonvulsivante da DC. No entanto, demonstrou que o uso da DC, por 4 semanas, apresentou uma ação neuroprotetora em uma das regiões do hipocampo, hilus, o que poderia contribuir na diminuição da frequência das crises recorrentes e espontâneas. Ainda neste estudo, pode-se aferir que DC, *per se*, aumenta a astrogliose, dado interessante, embora ainda não exista uma explicação sobre os mecanismos associados às causas e efeitos deste aumento. Apesar de não apresentar diferença significativa, pode-se observar uma tendência na diminuição da expressão de TNF- α , após o uso da DC por, 4 semanas, podendo caracterizar uma diminuição nos efeitos inflamatórios somente nas primeiras horas pós SE, no período agudo inicial da epileptogênese.

No entanto, pesquisas adicionais são necessárias a fim de contribuir para a compreensão dos mecanismos que associam a DC à epileptogênese, assim como para aumentar o fator de evidência da DC envolvida na proteção neuronal.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE-VALENÇA, L. P. A. et al. Epilepsia do lobo temporal mesial associada à esclerose hipocampal. **Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiol.** v. 12, n. 1, p. 31-36, 2006;
- ARISI, G. M. et al. Increased CCL2, CCL3, CCL5, and IL-1 β cytokine concentration in piriform cortex, hippocampus, and neocortex after pilocarpine-induced seizures. **Journal of Neuroinflammation.** v.12, p.1-7, 2015;
- BABB, T.L. Bilateral pathological damage in temporal lobe epilepsy. **Can J Neurol Sci.** v. 18, Suppl. 4, p. 645-8, 1991;
- BARABAN, S. C. et al. Drug screening in Scn1a zebrafish mutant identifies clemizole as a potential Dravet syndrome treatment. **Nat Commun.** v.4, p.2410, 2013;
- BOLOSSO, S. et al. Tumor necrosis factor- α inhibits seizures in mice via p75 receptors. **Annals of Neurology.** v. 57, p. 804–812, 2005;
- BOUGH, K.J. et al. An anticonvulsant profile of the ketogenic diet in the rat. **Epilepsy Research.** v. 50, p. 313-325, 2002;
- BOUGH, K.J. et al. An anticonvulsant profile of the ketogenic diet in the rat. **Epilepsy Research.** v. 50, p. 313-325, 2002;
- BOUGH, K.J. et al. Mitochondrial Biogenesis in the Anticonvulsant Mechanism of the Ketogenic Diet. **Ann Neurol.** v.60, p.223–235, 2006.
- BOUGH, K. J; EAGLES, D. A. A ketogenic diet increases the resistance to pentylenetetrazole-induced seizures in the rat. **Epilepsia.** v. 40, n 2, p. 138-43,1999.
- BOUGH, K. J. e EAGLES, D. A. Comparison of the anticonvulsant efficacies and neurotoxic effects of valproic acid, phenytoin, and the ketogenic diet. **Epilepsia** v. 42, n. 10, p. 1345-53, 2001;
- BOUGH, K. J; RHO, J.M. Anticonvulsant mechanisms of the ketogenic diet. **Epilepsia.** v. 48, n. 1, p. 43-58, 2007;
- BORGES, K. et al. Neuronal and glial pathological changes during epileptogenesis in the mouse pilocarpine model. **Experimental Neurology.** v. 182, p. 21–34, 2003;
- BUCKMASTER, P. S.; DUDEK, F. E. Network properties of the dentate gyrus in epileptic rats with hilar neuron loss and granule cell axon reorganization. **Journal of Neurophysiology.** v. 77, n. 5, p. 2685-2696, 1997;

CAPPOLA, G. *et al.* Ketogenic diet for the treatment of catastrophic epileptic encephalopathies in childhood. **European journal of pediatric neurology**. v.14, p. 229–234, 2010;

CARABALLO, R. *et al.* Long-term follow-up of the ketogenic diet for refractory epilepsy: multicenter Argentinean experience in 216 pediatric patients. **Seizure**. n.8, p. 640-5, 2011;

CARABALLO, R. H. *et al.* Febrile infection-related epilepsy syndrome: a study of 12 patients. **Seizure**. v.22, n. 7, p. 553-9, 2013;

CAVALHEIRO, E.A. The pilocarpine model of epilepsy. *Ital J Neurol Sci*; v.16, p. 33–37, 1995;

CHINESE MEDICAL ASSOCIATION. Prospective multicenter study on long-term ketogenic diet therapy for intractable childhood epilepsy. *Zhonghua Er Ke Za Zhi*.v.51, n. 4, p. 276-82, 2013;

DRESSER, A. *et al.* Long-term outcome and tolerability of the ketogenic diet in drug-resistant childhood epilepsy--the Austrian experience. **Seizure**. v.19, n.7, p. 404-8, 2010;

ENGEL, J. *et al.* Mesial temporal lobe epilepsy. In Engel J Jr, Pedley TA (Eds). *Epilepsy: a comprehensive textbook*. Philadelphia: Lippincott-Raven. p. 2417-2426, 1997;

ENGEL, J. Jr. Intractable epilepsy: definition and neurobiology. **Epilepsia**. Suppl. 42, p. 6:3, 2001;

FENOGLIO-SIMEONE, K.A., *et al.* Ketogenic diet treatment abolishes seizure periodicity and improves diurnal rhythmicity in epileptic *Kcna1*-null mice. *Epilepsia*. v. 50, n.9, p. 2027-34, 2009;

GAMA, I.R. *et al.* Effects of ketogenic diets on the occurrence of pilocarpine-induced status epilepticus of rats. **Metab Brain Dis**. v. 30, n. 1, p. 93-98, 2014;

GASTAUT H, *et al.* Relative frequency of different types of epilepsy. A study employing the classification of the International League Against Epilepsy. **Epilepsia**. n. 16, p. 457–461, 1975;

GUEDES, F.A. *et al.* Plasticidade neuronal associada à epilepsia do lobo temporal mesial: insights a partir de estudos em humanos e em modelos animais. **Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology**. v.12, sup.1, p.10-17, 2006;

HANSEN, S.L. *et al.* Ketogenic diet is antiepileptogenic in pentylenetetrazole kindled mice and decrease levels of N-acylethanolamines in hippocampus. *Neurochem Int*. v. 54, n.3-4, p. 199-204, 2009;

INTERNATIONAL LEAGUE AGAINST EPILEPSY (ILEAE). Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. **Epilepsia**. n. 30, p.389–399, 1989;

JEON, B. T. *et al.* Ketogenic diet attenuates kainic acid-induced hippocampal cell death by decreasing AMPK/ACC pathway activity and HSP70. **Neurosci Lett**. v. 453, n. 1, p.49-53, 2009;

JEONG, H. J. *et al.* The ketogenic diet suppresses the cathepsin E expression induced by kainic acid in the rat brain. **Yonsei Med J**. v. 51, n. 5, p. 653-60, 2010;

JEONG, E.A. *et al.* Ketogenic diet-induced peroxisome proliferator-activated receptor- γ activation decreases neuroinflammation in the mouse hippocampus after kainic acid-induced seizures. **Exp Neurol**. v. 232, n. 2, p. 195-202, 2011;

LEMOS, T; CAVALHEIRO, E. A. Suppression of pilocarpine-induced status epilepticus and the late development of epilepsy in rats. **Exp Brain Res**. v. 102, p. 423-28, 1995;

LI, B.M. *et al.* Influence of ketogenic diet on the clinical effects and electroencephalogram features in 31 children with pharmacoresistant epileptic encephalopathy. **Zhonghua Er Ke Za Zhi**. v.51, n. 5, p. 362-6, 2013;

LI, D. F. *et al.* Effect of fat sources and combinations on starter pig performance, nutrient digestibility and intestinal morphology. **American Association for Laboratory Animal Science**. v. 68, p. 3694-3704, 1990;

LIAN, X. Y.; KHAN, F. A.; STRINGER, J. L. Fructose-1,6-bisphosphate has anticonvulsant activity in models of acute seizures in adult rats. **J Neurosci**. v. 31, n. 27, p. 44, 2007;

LINARD, B. *et al.* Ketogenic diet exhibits neuroprotective effects in hippocampus but fails to prevent epileptogenesis in the lithium-pilocarpine model of mesial temporal lobe epilepsy in adult rats. **Epilepsia**. v. 51, n. 9, p. 1829-36, 2010;

LOWENSTEIN, D.H.; ALLDREDGE, B.K. Status epilepticus. **N Engl J Med**. v. 338, n. 14, p 970-6, 1998;

LUAN G. *et al.* Ketogenic diet reduces Smac/Diablo and cytochrome c release and attenuates neuronal death in a mouse model of limbic epilepsy. **Brain Res Bull**. v. 89, n. 3-4, p. 79-85, 2012;

LUCENA, A. L. M. *et al.* High-fat diet based on trienantin has no adverse metabolic effects in rats. **European Journal of Lipid Science and Technology**. v. 112, p.166–172, 2010.

YUDKOFF, M. *et al.* The ketogenic diet and brain metabolism of amino acids: relationship to the anticonvulsant effect. **Annual Review of Nutrition**. v. 27, p. 415-430, 2007;

KANG, J. W. *et al.* Seizure outcome of infantile spasms with focal cortical dysplasia. *Brain Dev.* v. 35, n. 8, p. 816-20, 2013;

KESSLER, S.K. *et al.* Early EEG Improvement after Ketogenic Diet Initiation. *Epilepsy Res.* v.94, n.1-2, p. 94–101, 2011;

KOBOW, K. *et al.* Deep sequencing reveals increased DNA methylation in chronic rat epilepsy. *Acta Neuropathol.* v.126, p.741–756, 2013;

KOSSOFF, E. H. *et al.* Optimal clinical management of children receiving the ketogenic diet: Recommendations of the International Ketogenic Diet Study Group. *Epilepsia.* v. 50, n. 2, p. 304-317, 2008;

KRESYUN, V. I. *et al.* Changes in brain cortex sensitivity to epileptogens under conditions of ketogenic diet. *Bull Exp Biol Med.* v. 54, n. 4, p. 457-9, 2013;

KWON, Y. S. *et al.* Effects of the keto.genic diet on neurogenesis after kainic acid-induced seizures in mice. *Epilepsy Res.* v. 78, n. 2-3, p. 186-94, 2008;

MA, W; BERG, J; YELLEN, G. Ketogenic diet metabolites reduce firing in central neurons by opening KATP channels. *The Journal of Neuroscience.* v.47, n.14, p. 3618–3625, 2007;

MAALOUF, M. *et al.* Ketones inhibit mitochondrial production of reactive oxygen species production following glutamate excitotoxicity by increasing NADH oxidation. *Neuroscience.* v. 145, n. 1, p. 256-64. 2007;

MASINO, S. A. *et al.* A ketogenic diet suppresses seizures in mice through adenosine A1 receptors. *The Journal of Clinical Investigation.* v. 121, n.7, p. 2548-2683, 2011. *Epilepsia* v.50, n. 5, p.1109–1117, 2009;

MCDANIEL, S. S. *et al.* The ketogenic diet inhibits the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway. *Epilepsia.* v. 52, n.3, p. 7-11, 2011;

MCNAMARA, J.O. Cellular and Molecular Basis of Epilepsy. *The Journal of Neuroscience.* v. 14, n. 6, p. 3413-3425, 1994;

MATHERN, G.W. The pathogenic and progressive features of chronic human hippocampal epilepsy. *Epilepsy Res.* v. 26, n. 1, p. 151-61, 1996;

NEAL, E. G. *et al.* A randomized trial of classical and medium-chain triglyceride ketogenic diets in the treatment of childhood epilepsy. *The lancet neurology.* v. 7, p 500-506, 2008;

NEVIN, K. G.; RAJAMOHAN, T. Beneficial effects of virgin coconut oil on lipid parameters and in vitro LDL oxidation. *Clinical Biochemistry.* v. 37, p. 830-835, 2004;

- NISSINEN, J; LUKASIUK, K.; PITKÄNEN, A. Is mossy fiber sprouting present at the time of the first spontaneous seizures in rat experimental temporal lobe epilepsy? **Hippocampus**. v.11, p. 299 –310, 2001;
- NOH, H. S. *et al.* The protective effect of a ketogenic diet on kainic acid-induced hippocampal cell death in the male ICR mice. **Epilepsy Res**. n. 53, p.1-2, 2003;
- NOH, H. S. *et al.* Ketogenic diet increases calbindin-D28k in the hippocampi of male ICR mice with kainic acid seizures. **Epilepsy Res**. v. 65, n. 3, p.153-9, 2005a.
- NOH, H. S. *et al.* Ketogenic diet prevents clusterin accumulation induced by kainic acid in the hippocampus of male ICR mice. **Brain Res**. v. 1042, n.1, p.114-8, 2005b.
- NOH, H. S. *et al.* Ketogenic Diet Protects the Hippocampus From Kainic Acid Toxicity by Inhibiting the Dissociation of Bad From 14-3-3. **J Neurosci Res**. v. 84, n.8, p.1829-36, 2006a;
- NOH, H. S. *et al.* Ketogenic diet decreases the level of proenkephalin mRNA induced by kainic acid in the mouse hippocampus. **Neurosci Lett**. v. 395, n.1, p. 87-92. 2006b;
- NOH, H. S. *et al.* Neuroprotective effects of the ketogenic diet. **Epilepsia**. n. 8, p. 120-8, 2008;
- NONINO-BORGES, C. B. *et al.* The ketogenic diet on the treatment of drug resistant epilepsies. **Rev. Nutr**. v.17, n. 4, p. 515 – 521, 2004;
- PAXINOS G., WATSON C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinate, Compact **Third Edition**. New York: Academic Press, 1996;
- RACINE, R. J. Modification of seizure activity by electrical stimulation: II. Motor seizure. **Electroencephalography and Clinical Neurophysiology**. v. 32, p. 281 – 294, 1972;
- RAFFO, E. *et al.* Calorie-restricted ketogenic diet increases thresholds to all patterns of pentylenetetrazol-induced seizures: critical importance of electroclinical assessment. **Epilepsia**. v. 49, n. 2, p. 320-8. 2008;
- REDDY D. S.; KURUBA, R. Experimental models of status epilepticus and neuronal injury for evaluation of therapeutic interventions. **Int. J. Mol. Sci**. v. 14, p.18284-18318, 2013;
- REEVES, P. G. Components of the AIN-93 Diets as Improvements in the AIN-76A Diet. **J. Nutr**. v. 127, p. 838 – 841, 1997;
- RHO, J. M. *et al.* Age-dependent differences in flurothyl seizure sensitivity in mice treated with a ketogenic diet. **Epilepsy Research**. v. 37, p. 233 – 240, 1999;
- ROMCY-PEREIRA, R. N. *et al.* Genes e epilepsia II: expressão gênica diferencial. **Rev. Assoc. Med. Bras**. v.54, n.5, p. 461-466, 2008;

- ROSSI, A.R. *et al.* Gabapentin Administration Reduces Reactive Gliosis and Neurodegeneration after Pilocarpine-Induced Status Epilepticus. **PLoS ONE**. v. 8, n. 11, p. e78516, 2013;
- SAMALA, R; WILLIS, S.; BORGES, k. Anticonvulsant profile of a balanced ketogenic diet in acute mouse seizure models. **Epilepsy Res**. v. 81, n. 2-3, p.119-27, 2008;
- SCHMUED, L. C. *et al.* Fluoro-Jade: a novel fluorochrome for the sensitive and reliable histochemical localization of neuronal degeneration. **Brain Research**. n. 751, p.37—46, 1997;
- SCHWARTZKROIN, P.A. Mechanisms underlying the anti-epileptic efficacy of the ketogenic diet. **Epilepsy Res**. v. 37, n. 3, p.171-80, 1999.
- SCORZA, F. A. *et al.* The pilocarpine model of epilepsy: what have we learned? **An. Acad. Bras. Ciênc**. v. 81, n. 3, p. 345-365, 2009.
- SILVA, M. C. *et al.* Transitory gliosis in the CA3 hippocampal region in rats fed on a ketogenic diet. **Nutritional Neuroscience**, v. 8, n. 4, p. 259–264, 2005;
- SHARMA, A. K. Mesial Temporal Lobe Epilepsy: Pathogenesis, Induced Rodent Models and Lesions. **Toxicol Pathol**, n. 35, p. 984-99, 2007;
- SHORVON, S.The outcome of tonic-clonic status epilepticus. **Curr Opin Neurol**. v. 7, n. 2, p. 93-5, 1994;
- STAFSTROM, C. E. Animal models of the ketogenic diet: what have we learned, what can we learn? **Epilepsy Research**. v. 37, p. 241 – 259, 1999;
- STAFSTROM, C.E. Dietary approaches to epilepsy treatment: old and new options on the menu. **Epilepsy Curr**. v. 4, n. 6, p.215-22, 2004;
- SU, J. *et al.* Role for pro-inflammatory cytokines in regulating expression of gaba transporter type 1 and 3 in specific brain regions of kainic acid-induced status epilepticus. **Neurochem Res**. v. 40, p. 621–627, 2015;
- SU, W. S. *et al.* Timing of ketogenic diet initiation in an experimental epilepsy model. **Developmental Brain Research**. v. 125, p.131–138, 2000;
- SUO, C. *et al.* Efficacy and safety of the ketogenic diet in Chinese children. **Seizure**. v. 22, n. 3, p. 174-8, 2013;
- THAVENDIRANATHAN, P. *et al.* The MCT ketogenic diet: effects on animal seizure models. **Exp Neurol**. v.161, n. 2, p. 696-703, 2000;
- THIELE, E.A. Assessing the efficacy of antiepileptic treatments: the ketogenic diet. **Epilepsia**. v.44, p.26–29, 2003;
- TRAUL, K. A. *et al.* Review of the toxicologic properties of medium-chain triglycerides. **Food Chem Toxicol**. v. 38, p. 79-98, 2000;

UHLEMANN, E.R; NEIMS, A.H. Anticonvulsant properties of the ketogenic diet in mice. *J Pharmacol Exp Ther.* v.180, p. 231–8, 1972;

VAMECQ, J. *et al.* Antiepileptic popular ketogenic diet emerging twists in na ancient story. **Prog Neurobiol.** v. 75, p.1–28, 2005;

VILLENEUVE, N. *et al.* The ketogenic diet improves recently worsened focal epilepsy. **Dev Med Child Neurol.** v. 51, n. 4, p.276-81, 2009;

WALDBAUM, S.; PATEL, M. Mitochondrial oxidative stress in temporal lobe epilepsy. **Revista de epilepsia.** v. 88, n. 1, p. 23-45, 2010;

WANG, N. *et al.* Minocycline inhibits brain inflammation and attenuates spontaneous recurrent seizures following pilocarpine-induced status epilepticus. **Neuroscience.** v. 287, p. 144–156, 2015;

WILDER, R.M. The effects of ketonemia on the course of epilepsy. *Mayo Clin Proc.* n. 2, p.307–308, 1921;

XU, X.; SUM, R; JIM, R. Effect of ketogenic diet on hippocampus mossy fiber sprouting and GluR5 expression in kainic acid induced rat model. *Chin Med J (Engl).* v. 20,n. 119, p. 22, 2006;

XU, X.; SUM, R; JIM, R. The effect of the ketogenic diet on hippocampal GluR5 and Glu(6 mRNA expression and Q/R site editing in the kainate-induced epilepsy model. **Epilepsy Behav.** v. 13, n. 3, p. 445-8, 2008;

ZANG, L. *et al.* FDG-PET and NeuN-GFAP Immunohistochemistry of Hippocampus at Different Phases of the Pilocarpine Model of Temporal Lobe Epilepsy. **International Journal of Medical Sciences.** v. 12, n. 3, p. 288-294, 2015;

ZHAO, Q. *et al.* Detrimental effects of the ketogenic diet on cognitive function in rats. **Pediatr Res.** v. 55, n. 3, p. 498-506, 2004.

ANEXO

Anexo 01 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UFAL

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Maceió, 02 de agosto de 2013

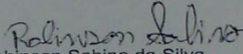
ROTEIRO DE PARECER CONSUBSTANCIADO

Projeto de pesquisa: DIETA CETOGÊNICA À BASE DE ÓLEO DE COCO E *STATUS EPILEPTICUS* INDUZIDO POR INJEÇÃO INTRAPERITONEAL DE PILOCARPINA, EM RATOS: EFEITOS SOBRE O TECIDO NERVOSO (34/2013)

Coordenador: Profa. Terezinha da Rocha Ataíde, FANUT/UFAL

Objetivo: Investigar os efeitos morfo-funcionais no tecido cerebral de ratos tratados com dieta cetogênica à base de óleo de coco e submetidos à indução do *Status Epilepticus* por injeção intraperitoneal de pilocarpina.

Situação: **Aprovado**


Robinson Sabino da Silva
Coordenador CEUA-UFAL

Robinson Sabino da Silva
Coordenador da CEUA-UFAL
Comissão de Ética no Uso de Animais