

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE SAÚDE PÚBLICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO EM SAÚDE PÚBLICA

**Impacto da dieta cetogênica rica em MUFAS e PUFAS e suplementada com
DHA sobre parâmetros oxidativos, inflamatórios e comportamentais**

Glaucivan Gomes Gurgel

Dissertação de Mestrado submetido ao
programa de Pós-graduação em Nutrição em
Saúde Pública para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Área de concentração: Nutrição em Saúde
Pública

Orientadora: Profa. Assoc. Dra. Nágila
Raquel Teixeira Damasceno

São Paulo
2023

GLAUCIVAN GOMES GURGEL

**Impacto da dieta cetogênica rica em MUFAS e PUFAS e suplementada com
DHA sobre parâmetros oxidativos, inflamatórios e comportamentais**

Versão revisada

Dissertação de Mestrado submetido ao
programa de Pós-graduação em Nutrição em
Saúde Pública para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Área de concentração: Nutrição em Saúde
Pública

Orientadora: Profa. Assoc. Dra. Nágila
Raquel Teixeira Damasceno

São Paulo
2023

GURGEL, G. G. Impacto da dieta cetogênica rica em MUFAS e PUFAS e suplementada com DHA sobre parâmetros oxidativos, inflamatórios e comportamentais [mestrado]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública; 2023.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof (a). Dr (a). _____
Instituição: _____
Julgamento: _____

Prof (a). Dr (a). _____
Instituição: _____
Julgamento: _____

Prof (a). Dr (a). _____
Instituição: _____
Julgamento: _____

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação

Ficha elaborada pelo Sistema de Geração Automática a partir de dados fornecidos pelo(a) autor(a) Bibliotecária da FSP/USP: Maria do Carmo Alvarez - CRB-8/4359

Gomes Gurgel, Glaucivan

Impacto da dieta cetogênica rica em MUFAS e PUFAS e suplementada com DHA sobre parâmetros oxidativos, inflamatórios e comportamentais / Glaucivan Gomes Gurgel; orientadora Nágila Raquel Teixeira Damasceno. -- São Paulo, 2023.

113 p.

Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 2023.

1. dieta cetogênica. 2. ácidos graxos saturados e poli insaturados. 3. DHA. 4. comportamento. 5. estresse oxidativo e inflamação. I. Raquel Teixeira Damasceno, Nágila, orient. II. Título.

RESUMO

Impacto da dieta cetogênica rica em MUFAS e PUFAS e suplementada com DHA sobre parâmetros oxidativos, inflamatórios e comportamentais.

Introdução – A dieta cetogênica (DC) tem sido utilizada como tratamento adjuvante da epilepsia fármaco resistente e tem se popularizado no manejo de outras doenças neurológicas e metabólicas (obesidade, diabetes e dislipidemias). Entretanto, também está associada a efeitos adversos que precisam ser melhor compreendidos. **Objetivo** - Avaliar o potencial efeito protetor de uma dieta cetogênica modificada (DCM), rica em ácidos graxos monoinsaturados (MUFAs) e ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs), e suplementada com ácido docosahexaenóico (DHA), sobre a neuroinflamação e o estresse oxidativo e suas repercussões no comportamento de ratos. **Materiais e Métodos** – Estudo experimental com 18 ratos Wistar, alocados em 3 grupos de 6 animais. No grupo da dieta padrão (DP), os animais consumiram dieta comercial. No grupo da dieta cetogênica clássica (DCC), os animais consumiram uma dieta rica em gorduras saturadas. No grupo DCM, os animais consumiram dieta rica em MUFAs e PUFAs e enriquecida com DHA. Após 100 dias de intervenção foram realizados testes comportamentais e, após a eutanásia, foram feitos extratos lipídico e aquoso do lobo frontal e do hipocampo para análise de ácidos graxos e parâmetros oxidativos e inflamatórios. **Resultados** – Os animais DCC apresentaram um comportamento mais ansioso que ao animais DP, segundo os testes de Labirinto em Cruz Elevado e Medo ao Contexto. O grupo DCC teve mais incorporação de ácidos graxos saturados (AGs) no lobo frontal e no hipocampo em relação ao DCM. O grupo DCM teve maior incorporação de PUFAs, com destaque para o aumento de DHA no hipocampo. As citocinas inflamatórias IL1- β e IL-6 tiveram menor concentração nos grupos DCM e DCC em relação ao grupo DP no lobo frontal, perfil semelhante ao observado com a IL-6 no hipocampo, e diferente da IL1- β que foi reduzida significativamente apenas no DCM. Não houve diferença da concentração da Neuroprotectina D (NPD) e da enzima antioxidante Superóxido Dismutase (SOD) entre os grupos. A LDLox teve menor concentração nos grupos DCC e DCM em relação ao DP. A enzima catalase (CAT) foi menor no grupo DCM em relação ao grupo DP. **Conclusão** – Embora a modulação da composição de ácidos graxos da DC possa ser promissora, uma vez que a DCC induziu a um estado mais ansioso, não foi possível explicar essa diferença pelas vias inflamatória e antioxidante avaliadas.

Descritores: dieta cetogênica; ácidos graxos saturados; ácidos graxos poli-insaturados; ácidos graxos ω -3; DHA; estresse oxidativo; inflamação; comportamento

ABSTRACT

Impact of a ketogenic diet rich in MUFAS and PUFAS and supplemented with DHA on oxidative, inflammatory and behavioral parameters.

Introduction – The ketogenic diet (KD) has been applied as an adjuvant treatment for drug-resistant epilepsy and has become popular in the management of other neurological and metabolic diseases (obesity, diabetes and dyslipidemia). However, it is also associated with adverse effects that need to be better understood. **Objective** - To evaluate the potential protective effect of a modified ketogenic diet (MKD), rich in monounsaturated fatty acids (MUFAs) and polyunsaturated fatty acids (PUFAs), and supplemented with docosahexaenoic acid (DHA), on neuroinflammation and oxidative stress and their repercussions on the behavior of rats. **Materials and Methods** – Experimental study with 18 Wistar rats, allocated into 3 groups of 6 animals. In the standard diet (SD) group, the animals consumed a commercial diet. In the classical ketogenic diet (CKD) group, the animals consumed a diet rich in saturated fats. In the MKD group, the animals consumed a diet rich in MUFAs and PUFAs and enriched with DHA. After 100 days of intervention, behavioral tests were carried out and, after euthanasia, lipid and aqueous extracts were made from the frontal lobe and hippocampus for analysis of fatty acids and oxidative and inflammatory parameters. **Results** – The CKD animals showed more anxious behavior than the DP animals, according to the Elevated Cross Maze and Context Fear tests. The CKD group had more incorporation of saturated fatty acids (SFAs) in the frontal lobe and hippocampus compared to MKD. The MKD group had greater incorporation of PUFAs, with emphasis on the increase in DHA in the hippocampus. The inflammatory cytokines IL1- β and IL-6 had lower concentrations in the MKD and CKD groups compared to the PD group in the frontal lobe, a profile similar to that observed with IL-6 in the hippocampus, and different from IL1- β , which was significantly reduced in the MKD. There was no difference in the concentration of Neuroprotectin D (NPD) and the antioxidant enzyme Superoxide Dismutase (SOD) between the groups. LDLox had a lower concentration in the CKD and MKD groups compared to the DP. The catalase enzyme was lower in the MKD group compared to the DP group. **Conclusion** – Although the modulation of the fatty acid composition of KD may be promising, since CKD induced a more anxious state, it was

not possible to explain this difference through the inflammatory and antioxidant pathways evaluated.

Descriptors: ketogenic diet; saturated fatty acids; polyunsaturated fatty acids; ω -3 fatty acids; DHA; oxidative stress; inflammation; behavior

AGRADECIMENTOS

Família é o princípio, é a formação e é o apoio nos momentos mais delicados e fundamentais da vida. Painho nos deu o melhor possível. Agradeço a ele minha boa formação básica. Foi graças ao seu esforço que pude cursar uma universidade pública no Ceará e seguir estudando. Mainha sempre esteve do nosso lado, estimulando-nos a sermos bons homens e comemorando nossas vitórias. Sem seu amor e confiança incondicional eu não iria longe. Meu irmão mais velho, Glauton, foi exemplo de inteligência e estudo. Sua sagacidade e esperteza me impulsionaram em muitos momentos, até mesmo quando ele se juntava com os outros jogadores do War para me eliminar do jogo. Deixava claro que também respeitava minha própria sagacidade e esperteza. Germano, meu irmão mais novo, apoia minhas aventuras estudantis e sempre me desafiou com sua mente igualmente aguçada. Haninha, minha sobrinha irmã, torce por mim, bem sei. Assim como torço e tenho grande admiração por sua determinação que também me inspira. Aproveito o ensejo e agradeço também aos meus inspiradores avós, vovó Maria, Voinha e seu Nertan, bem como meus tios e meus sobrinhos.

Aqui cabe uma citação especial ao curioso e culto Orlando Simões, meu sobrinho afim/filho que, ao se enveredar pela Nutrição e me instigar ao travar discussões científicas comigo sobre o assunto, muito me estimulou a retomar os estudos nessa área da saúde.

Meu companheiro Simões tem sido minha fortaleza. Temos nos apoiado e incentivado profissionalmente há bons 27 anos. Ele representa minha dedicação a uma relação sincera e profunda de amor e amizade. É incrível como ele apoia minhas aventuras acadêmicas, que não têm sido poucas. Obrigado Dunts!

Nágila Raquel Teixeira Damasceno é bem mais que minha orientadora. É minha musa inspiradora, além de minha amiga e colega de formação em Nutrição. Foi um imenso prazer esse reencontro. Uma descoberta de como minha amiga se tornou grande na Nutrição. Sua dedicação e paixão pelo que faz são muito inspiradores. Obrigado por me orientar nesse novo momento da minha vida, em que resolvi me ver novamente como pesquisador, compartilhando contigo essa sede de respostas tão importantes para a alimentação, saúde e para a vida das pessoas!

Falando ainda em inspiração, não posso deixar de agradecer a outra amiga e colega de formação, a Carla Soraya Costa Maia, que também sempre mostrou muita tenacidade e dedicação inspiradoras. Junto com ela, foram também inspiradoras as queridas

companheiras do laboratório de Nutrição Experimental da UECE, entre elas, Helena. E nosso instigante professor Augusto Reinaldo Pimentel Guimarães, também.

Paralelamente ao Mestrado participei de outro laboratório de pesquisa no meu curso de Bacharelado em Educação Física. Foram meses de aprendizado que também me ajudaram na caminhada da pós-graduação. Agradeço à minha orientadora na UNINOVE, a professora Kátia de Angelis, e aos meus colegas de laboratório, especialmente Antônio, Marina, Pietra, Tânia e Douglas.

Quando me juntei ao CETO USP, não sabia como seria recebido. Foi lindo! As meninas da iniciação, Andrea e Duda, além de pessoas doces e dedicadas, foram incrivelmente receptivas e acolhedoras. Julia entrou comigo e logo vi que seria uma parceira excelente nas aventuras científicas. Passamos por poucas e boas e seguimos. Depois, juntou-se ao grupo a queridíssima Ribanna, conterrânea delicada, dedicada e muito versada na estatística. Juntou-se também à trupe, a Fernanda, com toda sua experiência de vida, também buscando novas possibilidades na área da Nutrição. E viva a nossa escriba! É maravilhoso o quanto nós nos apoiamos e nos ajudamos ao longo dos experimentos e no trato com os animais, Julia, Ribanna, Fernanda e eu. Lembro aqui também da dedicação da Amanda, que passou pelo grupo e deixou sua contribuição. Rosana sempre esteve no grupo como nossa técnica de referência. Se Nágila é musa, Rosana é fada. Sem ela, o laboratório não anda. Muito obrigado Rô! Mesmo não diretamente no grupo, tenho que lembrar o apoio incrível e incondicional de Geni e Liânia, outras fadas desse panteão, bem como todos os colegas da pós-graduação. Aqui, menção especial ao Leo, o elfo que me guiou aos resultados do BDNF e à Ingrid, que me iniciou nas artes literárias dos cromatogramas dos ácidos graxos.

Ainda no âmbito dos portões da FSP, nossas rações não teriam sido produzidas com tanto cuidado e acurácia, não fosse pela colaboração fundamental de Márcia e Malu do Laboratório e Cozinha Didática de Procedimentos e Técnicas Culinárias Aplicadas à Nutrição (PTCAN) a quem deixo meus agradecimentos sinceros.

Nosso projeto não ficou circunscrito aos portões da Faculdade de Saúde Pública. É preciso agradecer outros parceiros fundamentais. Nossos animais foram muito bem recebidos e guardados pelo Luiz Mundel e sua equipe do biotério do IMT. Luiz fez muito pelo bom andamento do projeto. Muito obrigado! Sofia Santos nos recebeu com muita delicadeza e atenção no IPEN para as análises com FDG. Obrigado! Assim também o fizeram, os professores Carla Scorza e Ricardo Arida na UNIFESP. Sem o Eduardo

Alves, pesquisador gentilmente indicado pelo professor Ricardo Arida, não teríamos resultados dos testes comportamentais. Obrigado a todos!

Cabe um agradecimento especial à Pós-graduação da Faculdade de Saúde Pública por me receber, orientar e proporcionar boas experiências nas aulas e eventos que participei, promovidos por uma das melhores universidades da América Latina e do mundo, a Universidade de São Paulo, USP.

Este estudo contou com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – 2020/03529-6), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES - 88887.646449/2021-0 e 88887.659109/2021-0)

Além disso, contamos com apoio parcial do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – 465259/2014-6), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), do Instituto Nacional de Fluidos do Complexo de Ciência e Tecnologia (INCT-Fcx) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – 2014/50983-3).

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Produção e mecanismo de ação dos corpos cetônicos.
- Figura 2** – Ciclo vicioso da crise energética degenerativa.
- Figura 3** - Reações bioquímicas de ROS/RNS e sua eliminação por antioxidantes endógenos celulares.
- Figura 4.** Mecanismos de ação do efeito ansiolítico da DC associada a probióticos.
- Figura 5.** Grupos experimentais DP, DCC e DCM.
- Figura 6** – (A) Exemplo de ração embalada. (B) Aspecto da ração da DCM.
- Figura 7.** Fluxo do experimento.
- Figura 8.** Índice de Discriminação (ID).
- Figura 9.** Índice de Ansiedade (IA).
- Figura 10.** Retirada do encéfalo da caixa craniana e ressecção do encéfalo à metade.
- Figura 11.** Ressecção do lobo frontal.
- Figura 12.** Ressecção do hipocampo.
- Figura 13.** Fluxo do plano amostral para o Lobo Frontal.
- Figura 14.** Fluxo do plano amostral para o hipocampo.
- Figura 15.** Integração de picos pela metodologia *valley to valley*.
- Figura 16.** Equação para cálculo da concentração de β -hidroxibutirato (BHB).
- Figura 17.** Inibição da Xantina Oxidase (XO) pela Superóxido Dismutase (SOD).
- Figura 18.** Fórmula para calcular a atividade da Superóxido Dismutase (SOD) a partir dos valores de absorvância dos 3 brancos e da amostra.
- Figura 19.** Fórmula para cálculo da concentração de formaldeído.
- Figura 20.** Fórmula para cálculo da atividade da catalase (CAT).
- Figura 21.** Consumo de (A) ração e de (B) calorias dos grupos DP, DCC e DCM ao longo do período experimental.
- Figura 22.** Consumo médio de (A) ração e de (B) calorias.
- Figura 23.** Consumo de água nos cinco tempos estudados.
- Figura 24.** Consumo médio de água.
- Figura 25.** Peso (A) e comprimento (B) aferidos ao longo do experimento.
- Figura 26.** Concentração de BHB no plasma nos animais.
- Figura 27.** Número de entradas nos braços abertos (A) e tempo de permanência nos braços fechados (B) do teste do Labirinto em Cruz Elevado.
- Figura 28.** Índice de ansiedade (IA).

- Figura 29.** Minuto 1 a 2 do segundo dia do teste de Medo ao Contexto.
- Figura 30.** Minuto 3 a 4 do segundo dia do teste de Medo ao Contexto.
- Figura 31.** Total de ácidos graxos saturados no LF.
- Figura 32.** Total de ácidos graxos poli-insaturados no LF.
- Figura 33.** Total de ácidos graxos saturados no HC.
- Figura 34.** Soma dos percentuais de área dos ácidos oleico e elaídico no HC.
- Figura 35.** Total de ácidos graxos poli-insaturados no HC.
- Figura 36.** DHA e Índice $\omega 3$ no HC.
- Figura 37.** Relação $\omega 6/\omega 3$ no HC.
- Figura 38.** IL 1- β , IL 10 e IL 6 no LF.
- Figura 39.** IL 1- β e IL 6 no HC.
- Figura 40.** Concentrações de LDLox no LF e no HC e CAT no HC.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Potencias efeitos benéficos e efeitos adversos da DC

Tabela 2. Composição nutricional teórica em proteínas, carboidratos, lipídeos e calorías estimadas para cada 100g das dietas DP, DCC 4:1 e DCM 4:1

Tabela 3. Composição nutricional teórica em proteínas, carboidratos, lipídeos, calorías, proporções de gorduras segundo grau de insaturação, e relação ω -6/ ω -3 estimados para 100g de cada uma das três proporções da DCC.

Tabela 4. Composição nutricional teórica em proteínas, carboidratos, lipídeos, calorías, proporções de gorduras, segundo grau de insaturação, ácidos graxos, e relação ω -6 / ω -3 estimados para 100g de cada uma das três proporções da DCM

Tabela 5. Coeficiente de Eficácia Alimentar (CEA) e Coeficiente de Ganho de Peso por Caloria Consumida (CGPCC) dos animais submetidos a tratamento com DP, DCC e DCM durante 100 dias de intervenção.

Tabela 6. Cetose medida a partir do sangue da cauda dos animais submetidos a tratamento com DP, DCC e DCM durante 100 dias de intervenção.

Tabela 7. Peso absoluto, peso relativo e comprimento do encéfalo dos animais submetidos a tratamento com DP, DCC e DCM durante 100 dias de intervenção.

Tabela 8. Resultados para o teste comportamental de Campo Aberto dos animais submetidos a tratamento com DP, DCC e DCM durante 100 dias de intervenção.

Tabela 9. Resultados para o teste comportamental Labirinto em Cruz Elevado dos animais submetidos a tratamento com DP, DCC e DCM durante 100 dias de intervenção.

Tabela 10. Resultados para o primeiro dia do teste de Reconhecimento de Objetos dos animais submetidos a tratamento com DP, DCC e DCM durante 100 dias de intervenção.

Tabela 11. Resultados para o segundo dia do teste de Reconhecimento de Objetos dos animais submetidos a tratamento com DP, DCC e DCM durante 100 dias de intervenção.

Tabela 12. Resultados para o primeiro dia do teste Medo ao Contexto dos animais submetidos a tratamento com DP, DCC e DCM durante 100 dias de intervenção.

Tabela 13. Resultados para o segundo dia do teste Medo ao Contexto dos animais submetidos a tratamento com DP, DCC e DCM durante 100 dias de intervenção.

Tabela 14. Resultados para o terceiro dia do teste Medo ao Contexto dos animais submetidos a tratamento com DP, DCC e DCM durante 100 dias de intervenção.

Tabela 15. Captação de FDG-18 nos compartimentos cerebrais dos animais submetidos a tratamento com DP, DCC e DCM durante 100 dias de intervenção.

Tabela 16. Ácidos graxos saturados no lobo frontal dos animais submetidos a tratamento com DP, DCC e DCM durante 100 dias de intervenção.

Tabela 17. Ácidos graxos monoinsaturados no lobo frontal dos animais submetidos a tratamento com DP, DCC e DCM durante 100 dias de intervenção.

Tabela 18. Ácidos graxos poli-insaturados no lobo frontal dos animais submetidos a tratamento com DP, DCC e DCM durante 100 dias de intervenção.

Tabela 19. Ácidos graxos saturados no hipocampo dos animais submetidos a tratamento com DP, DCC e DCM durante 100 dias de intervenção.

Tabela 20. Ácidos graxos monoinsaturados no hipocampo dos animais submetidos a tratamento com DP, DCC e DCM durante 100 dias de intervenção.

Tabela 21. Ácidos graxos poli-insaturados no hipocampo dos animais submetidos a tratamento com DP, DCC e DCM durante 100 dias de intervenção.

Tabela 22. Concentração de parâmetros bioquímicos no lobo frontal e no hipocampo dos animais submetidos a tratamento com DP, DCC e DCM durante 100 dias de intervenção.

Tabela 23. Concentração de marcadores relacionados à inflamação no lobo frontal e no hipocampo dos animais submetidos a tratamento com DP, DCC e DCM durante 100 dias de intervenção.

Tabela 24. Concentração de marcadores relacionados à oxidação nos compartimentos cerebrais dos animais submetidos a tratamento com DP, DCC e DCM durante 100 dias de intervenção.

LISTA DE ABREVIATURAS

- 8-OHdG: 8-Hidroxi-desoxiguanosina
- AA: ácido araquidônico
- AcAc: aceto-acetato
- AGNEs: ácidos graxos não esterificados
- AIN-93 G: *American Institute of Nutrition Rodent Diet for Growth - 1993*
- APA: *American Psychiatric Association*
- ApoB: apolipoproteína B
- ApoE4: variante epsilon 4 do gene da apolipoproteína E
- BHA: tert-butil-hidroquinona
- BHB: β -hidroxibutirato
- BHE: barreira hemato-encefálica
- BDNF: fator neurotrófico derivado do cérebro
- CA: campo aberto
- CAT: catalase
- CEA: coeficiente de eficácia alimentar
- CCs: corpos cetônicos
- CCD: charge-coupled device
- CGPCC: Coeficiente de Ganho de Peso por Caloria Consumida
- CGS: sistema cotransportador de cistina/glutamato
- CKD – *classical ketogenic diet*
- COX2: ciclooxigenase-2
- CT: tomografia computadorizada
- DA: doença de Alzheimer
- DC NSAFA: dieta cetogênica rica em ácidos graxos mono e poli-insaturados
- DC SAFA: dieta cetogênica rica em ácidos graxos saturados e colesterol
- DC: dieta cetogênica
- DCC: dieta cetogênica clássica
- DCM: dieta cetogênica modificada
- DFT: demência frontotemporal
- DHA: ácido docosaenoico
- DSM-5: Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais 5
- EDTA: ácido etilenodiaminotetracético

ELA: esclerose lateral amiotrófica
EPA: ácido eicosapentaenoico
EM: *expectation maximization* (maximização da expectativa)
FAEs: fármacos antiepilépticos
FAPESP: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FBP: retroprojeção filtrada de algoritmos
FDG 18-F: *fluorodeoxyglucose* marcada com flúor 18
FMUSP: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
FSP: Faculdade de Saúde Pública
GABA: ácido gama-aminobutírico
GABAA: ácido γ -aminobutírico, tipo A
GPx: glutatona peroxidase
GSH: glutatona
GSHred: glutatona redutase
GSSG: glutatona oxidada
H₂O₂: peróxido de hidrogênio
HCA2: receptor 2 do ácido hidroxí-carboxílico
HC: hipocampo
HDL-c: colesterol associado à lipoproteína de alta densidade
HOCl°: ácido hipocloroso
HT: hipotálamo
IA: índice de ansiedade
INCT: Instituto Nacional de Fluidos do Complexo de Ciência e Tecnologia
ID: índice de discriminação
IL-1 β : interleucina 1 β
IL-10: interleucina 10
IL-6: interleucina 6
IL-8: interleucina 8
IPEN: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
KD – *ketogenic diet*
LCE: labirinto em cruz elevado
LDL-c: colesterol associado à lipoproteína de baixa densidade
LDLox: lipoproteína de baixa densidade oxidada
LF: lobo frontal

MC: medo ao contexto

MKD – *modified ketogenic diet*

MLP: memória de longo prazo

MFI: *media fluorescence intensity*

mTORC1: complexo 1 do alvo da rapamicina em mamíferos

NADPH: fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo

NF-kB: fator nuclear kappa B

NLRP3: domínio pirina contendo 3 da família de receptores semelhantes a NOD

NMDA: N-metil-D-aspartato

NO: óxido nítrico

NOD: domínio de oligomerização de ligação a nucleotídeos

NOX: NADPH oxidase

NPD1: neuroprotectina D1

Nrf2: fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2

O₂^{•-}: radical ânion superóxido

OH[•]: radical hidroxila

ONOO[•]: radical peroxinitrito

OSEM: maximização de expectativa de subconjuntos ordenados

PET: *positron emission tomography*

PhO[•]: radical fenoxi

PPARs: receptores ativados por proliferadores de peroxissomos

PUFAs: ácidos graxos poli-insaturados

RO: reconhecimento de objetos

ROI: *region of interest*

ROS: espécies reativas de oxigênio

RNS: espécies reativas de nitrogênio

SNC: sistema nervoso central

SOD: superóxido dismutase

SPSS: *Statistical Package for the Social Sciences*®

TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TCM: triglicerídeos de cadeia média

TCL: triglicerídeos de cadeia longa

TDAH: transtorno do déficit de atenção e hiperatividade

TLR4: receptor do Tipo Toll 4

TNF- α : fator de necrose tumoral α

TRXox/red: tioredoxina oxidada e reduzida

TRXred: tioredoxina redutase

USDA: *United States Department of Agriculture*

USP: Universidade de São Paulo

VLCKD: dieta cetogênica muito baixa em calorias

WST-1: sal de tetrazólio altamente solúvel em água

XO: xantina oxidase

1. INTRODUÇÃO

1.1 Dieta Cetogênica: Aspectos históricos e Aplicação clínica

É impossível dissociar a dieta cetogênica (DC) de epilepsia, uma vez que essa estratégia dietoterápica surgiu como tratamento adjuvante às epilepsias fármaco-resistentes.

No início do século XX, MARIE (1911) relatou que os pacientes com epilepsia eram alimentados em demasia. Ela indicava educação alimentar com uma redução ajustada de alimentos como estratégia de tratamento. Em 1921, Geyelin confirmou que as crises epiléticas cessavam quando o paciente se submetia ao jejum (HÖHN, 2019). Baseado nessas informações, em 1921, Wilder sugeriu que os benefícios do jejum poderiam ser obtidos pela cetonemia produzida pela DC e que isso poderia ser feito por um período maior, uma vez que o jejum não seria sustentável sequer a médio prazo (HÖHN, 2019). Baseando-se nas informações de Wilder, PETERMAN (1924), também utilizou a DC descrevendo sua composição com 1g de proteína por kg de peso, 10 a 15g totais de carboidratos e o restante das calorias na forma de gorduras. Logo, outros médicos contemporâneos começaram a utilizar a DC e a relatar sucesso em seus tratamentos. BARBORKA (1930), por exemplo, publicou que, dos 100 pacientes tratados com a DC, 12 tiveram as crises controladas, 44 tiveram algum benefício de diminuição da frequência ou severidade das crises e os outros 44 não obtiveram qualquer benefício com o tratamento. No entanto, o advento de fármacos capazes de promover o controle das crises epiléticas ainda na década de 30, como a difenil hidantoína (MERRITT e PUTNAM, 1938), contribuiu para que as atenções se voltassem mais para o manejo farmacológico da epilepsia e a DC fosse sendo relevada ao segundo plano e ao desuso, pois era considerada muito estrita e dispendiosa (BARBORKA, 1930) e de baixa tolerabilidade, devida a sua palatabilidade ruim (MARTIN et al, 2016). A introdução do valproato de sódio, convenceu muitos neurologistas pediátricos que o uso da DC não se justificaria mais. Passaram-se algumas décadas com a DC mais restrita a alguns centros de tratamento da epilepsia, como o hospital John Hopkins (Estados Unidos), no qual ela era utilizada como adjuvante no tratamento das epilepsias refratárias, ou seja, nos casos em que o paciente não respondia adequadamente aos fármacos antiepiléticos (FAEs). A experiência acumulada neste hospital, aliada ao manejo clínico bem-sucedido de pacientes como Charlie Abrahams, motivaram seu pai, Jim Abrahams, a criar a Fundação

Charlie na década de noventa. A fundação, que reúne pesquisadores, pacientes e seus familiares passou a divulgar vídeos, publicações e conferências, contribuindo para estimular novas pesquisas sobre DC e epilepsia (STAFSTROM e RHO, 2004).

Isolados ou associados, os FAEs agem no controle das crises convulsivas por meio da modulação dos canais de sódio e cálcio dependentes de voltagem, aumento da inibição sináptica mediada pelo receptor de GABAA (ácido γ -aminobutírico, tipo A) e inibição da excitação sináptica mediada pelo receptor de glutamato ionotrópico (ROGAWSKI et al, 2004).

O principal mecanismo de ação da DC poderia se assemelhar ao que se espera do mecanismo de ação dos principais fármacos envolvidos no tratamento da epilepsia. Os corpos cetônicos (β -hidroxibutirato, acetoacetato e acetona) produzidos no fígado a partir dos ácidos graxos, seriam os principais mediadores dessa ação (KOSSOFF e HARTMAN, 2012). Eles são capazes de atravessar a Barreira Hemato Encefálica (BHE) e passam a nutrir as células cerebrais em substituição da glicose, potencializando o metabolismo aeróbico mitocondrial. Em sua publicação de 2008, YUDKOFF e colaboradores teorizaram que um dos mecanismos pelos quais os corpos cetônicos promoviam a redução das crises estava ligado a uma alteração na dinâmica do ciclo glutamato-glutamina, que levaria à remoção sináptica mais eficiente do glutamato pelos astrócitos e ao aumento na formação de glutamina, com consequente maior disponibilização de glutamato para a sua conversão em ácido γ -aminobutírico (GABA), um potente inibidor da atividade neuronal (**Figura 1**). Outros autores têm dado suporte a esta teoria (LIMA et al, 2014; ROGAWSKI et al, 2016; VERROTTI et al 2020).

A DC clássica (DCC) se estabeleceu, desde o início, como uma dieta hiperlipídica na proporção de 4:1, na qual 4 partes das calorias são fornecidas na forma de gorduras e 1 parte é composta por proteínas e carboidratos (MARTIN et al, 2016). Podem ser utilizadas DCC com proporções menores como 3:1 ou 2:1, nos casos em que há uma necessidade maior de proteínas para o crescimento e durante a adaptação da DC até alcançar uma maior proporção de gorduras. As calorias devem ser ajustadas de acordo com as necessidades nutricionais, uma vez que a restrição calórica não é mais um requisito da DC (LEE e KOSSOFF, 2011).

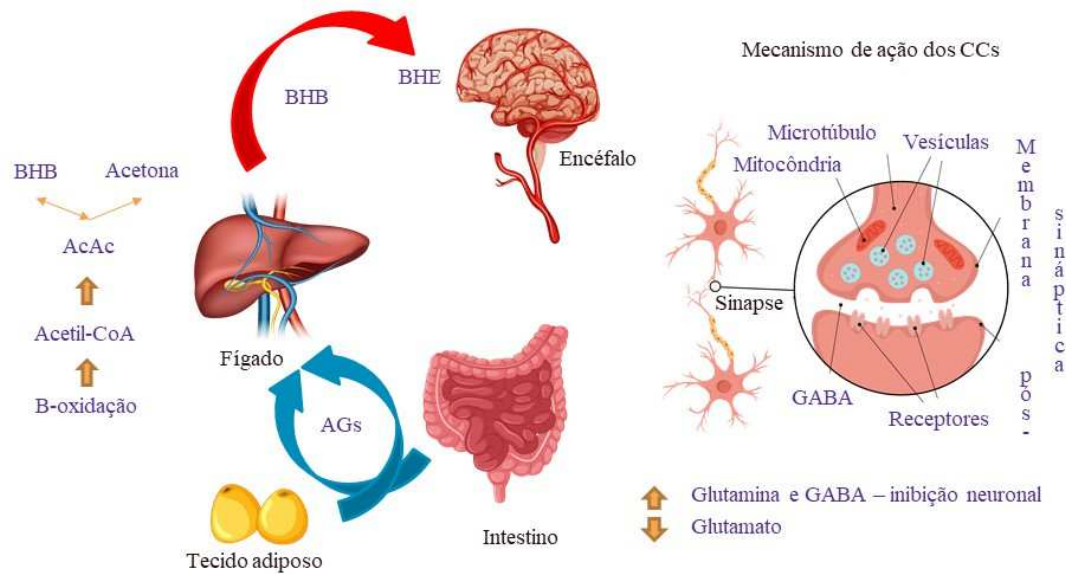


Figura 1. Produção e mecanismo de ação dos corpos cetônicos. AGs – Ácidos Graxos. BHB - β -hidroxibutirato. AcAc – Aceto-acetato. BHE - barreira hemato-encefálica. CCs – corpos cetônicos. GABA – ácido γ -aminobutírico.

Considerando as baixas palatabilidade e tolerabilidade da DCC, a estratégia de substituir parte dos alimentos ricos em gorduras, especialmente compostas por triglicerídeos de cadeia longa (TCL), por alimentos ricos em triglicerídeos de cadeia média (TCM) parecia promissora. Como os TCMs seriam mais rapidamente metabolizados e, por isso, mais cetogênicos, poderiam ser consumidos em menor quantidade, permitindo uma maior inclusão de alimentos fontes de carboidratos, por exemplo (HUTTENLOCHER, 1971). Em 1989, um grupo de pesquisadores realizou um estudo considerando a DC modificada, com 60% TCM e 11% de TCL e outras duas dietas, sendo uma DCC, com 90% de lipídios e a outra com DC modificada, contendo 30% de TCM e 41% de TCL (SCHWARTZ et al, 1989). Embora tenha havido algum sucesso na diminuição da frequência de crises, foram atribuídas mais complicações relacionadas à palatabilidade, e aos distúrbios gastrointestinais como vômitos e diarreia na DC modificada com maior percentual de TCM. Esse padrão de DC ficou conhecida como a *Radcliffe Infirmary diet* (STAFSTROM e RHO, 2004). Posteriormente, NEAL e colaboradores (2009) reproduziram esse estudo comparando com a DC e confirmaram os aspectos de tolerabilidade e efeitos adversos gastrointestinais. Mais recentemente, outras modificações da DC foram propostas, como a dieta de Atkins modificada, com uma proporção de 1:1 (gorduras: proteínas + carboidratos) e limitada a 10 a 20g de carboidratos por dia, com aparente melhora dos efeitos adversos, porém, sem resultados

expressivos em relação às crises (MARTIN et al, 2016). Outra alternativa à DCC é o tratamento de baixo índice glicêmico, criado no Hospital Geral de Massachusetts em 2002. O tratamento permite a ingestão diária de 40 a 60g de carboidratos de baixo índice glicêmico (<50) por dia, além de 20 a 30% de proteínas e cerca de 60% de gorduras (LEE e KOSSOFF, 2011). Uma revisão recente encontrou efeitos benéficos do uso desse tratamento em pacientes com epilepsia refratária e atribuiu-lhe melhor palatabilidade em relação à DCC, embora não tenha podido afirmar que seja efetivo no controle das crises convulsivas (REZAEI et al, 2018).

Recentemente, nosso grupo propôs uma nova modificação na DCC, com o intuito de torná-la menos aterogênica. O ensaio clínico, realizado com crianças e adolescentes com epilepsia refratária, atendidos no Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (ICr-HC-FMUSP) considerou a dieta cetogênica rica em ácidos graxos saturados e colesterol (DC SAFA), referindo-se à DCC, rica em gorduras saturadas, cujas fontes de gorduras eram creme de leite fresco, toucinho fresco, maionese industrializada e óleos vegetais em geral. Era permitido ainda o consumo de carnes processadas e embutidos. Por outro lado, a dieta cetogênica rica em ácidos graxos mono e poli-insaturados (DC NSAFA) propunha uma redução de 20% das gorduras saturadas, um aumento dos ácidos graxos monoinsaturados e poli-insaturados em pelo menos 50% e a redução da relação $\omega 6/\omega 3$ em pelo menos 50%. Foram indicados apenas o azeite de oliva e o óleo de canola para fornecer esse perfil de ácidos graxos. Além disso, foram proibidos as carnes processadas e os embutidos. O estudo comprovou a eficácia de ambas as dietas na redução e no controle das crises e mostrou um menor percentual de aumento da LDL-c, da APO-B, da relação LDL-c/HDL-c, no plasma das crianças que consumiram a DC NSAFA em relação ao grupo que consumiu a DC SAFA. Além disso, apenas a DC SAFA promoveu aumento dos ácidos graxos não esterificados (AGNEs). Outra diferença importante foi em relação ao perfil inflamatório e oxidativo, uma vez que a DC SAFA provocou aumento sérico do fator nuclear kappa B (NF-kB) e redução do Fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2) (PRUDENCIO, 2018).

Além do uso bem estabelecido como terapia adjuvante na epilepsia, tem-se investigado a utilidade da DC em outras doenças neurológicas como a doença de Alzheimer (DA). O uso da DC como estratégia adjuvante no manejo de pacientes com DA negativos para a variante epsilon 4 do gene da apolipoproteína E (ApoE4), um fator de risco genético para a DA, mostrou melhora cognitiva nos pacientes quando a DA era leve a moderada (LANGE et al, 2017). Por outro lado, um estudo comparativo da DC

com a dieta Mediterrânea indicou efeitos neuroprotetores de ambas as estratégias. Entretanto, esses mesmos autores chamam a atenção ao fato de que, embora a DC tenha se popularizado nos últimos anos, ainda não se têm dados suficientes de ensaios clínicos que garantam sua eficácia. Além disso, o consumo prolongado da DC poderia trazer riscos à saúde (VINCIGUERRA et al, 2020).

A DC também tem tido sua efetividade estudada no tratamento da obesidade, da diabetes tipo 2 e do câncer (MURUGAN e BOISON, 2020). Em relação ao tratamento da obesidade, uma revisão sistemática com metanálise baseada em 15 estudos e publicada em 2021, concluiu que uma DC muito baixa em calorias (VLCKD) poderia ser recomendada para o tratamento de indivíduos com obesidade severa e/ou com comorbidades que necessitam de uma perda substancial de peso, de maneira individualizada e após consideradas as contraindicações (observar os intervalos dos períodos e dos IMCS dos estudos). Além disso, a revisão elencou vários efeitos colaterais da VLCKD como desidratação, hipoglicemia transitória, halitose, náuseas, vômitos, diarreia, constipação, hiperuricemia, aumento na concentração de colesterol associado à lipoproteína de baixa densidade (LDL-c), hipoproteinemia, hipocalcemia com dano ósseo, urolitíase, cálculos biliares e alopecia (MUSCOGIURI et al, 2021).

No contexto cardiovascular, o estudo publicado por LIMA e colaboradores (2017) já havia mostrado que a DC promove efeitos adversos no tamanho e no fenótipo das lipoproteínas, contribuindo para o maior risco aterogênico nos pacientes com epilepsia submetidos à DCC no tratamento da epilepsia refratária. Estudos anteriores descreveram maior risco aterogênico atribuído à DC no desenvolvimento de dislipidemias, com o aumento significativo das lipoproteínas contendo a Apolipoproteína B (ApoB) e diminuição do conteúdo de HDL-c (KWITEROVICH et al, 2003), e das dislipidemias de maneira geral, especialmente após uso da DCC (NIZAMUDDIN et al, 2008). Mais recentemente, outros grupos de pesquisadores têm relatado resultados semelhantes do ponto de vista cardiovascular (GOLDBERG et al, 2021; CROSIER e McPHERSON, 2022). No Brasil, o posicionamento mais recente da ABESO estabelece que, por ser uma dieta muito radical, induzir diminuição de massa magra, não promover alimentação balanceada com equilíbrio entre os macro e micronutrientes e não favorecer a aderência a hábitos alimentares saudáveis, a DC não deve ser recomendada para o tratamento nutricional da obesidade (ABESO, 2022).

Com relação ao diabetes, um estudo randomizado comparando os efeitos da DC e da dieta Mediterrânea na hemoglobina glicada de indivíduos com pré-diabetes e diabetes

tipo 2, concluiu que não houve diferença entre as dietas para esse parâmetro, embora ambas tenham apresentado melhoras significativas ao longo do tempo. Além disso, a DC teria reduzido triglicerídeos e aumentado o LDL-c, além de ter levado à diminuição de folato, vitamina C e magnésio, sendo também considerada menos sustentável a longo prazo (GARDNER et al, 2022).

Uma revisão da literatura sobre DC e câncer indica que esse padrão dietético parece criar um ambiente metabólico desfavorável à proliferação de células cancerígenas. Os autores concluem que a DC tem potencial efeito adjuvante no tratamento oncológico, pois diminui a inflamação, reduz o crescimento tumoral e protege as células saudáveis dos danos da quimioterapia e da radiação (WEBER et al, 2020). Outro estudo afirma que o uso de uma DC que seja capaz de aumentar a produção de corpos cetônicos de modo que eles passem a ser a principal fonte de energia para o corpo, pode levar a uma melhora da resistência à insulina e da inflamação ao passo que priva células tumorais da glicose que seria utilizada na glicólise aeróbica. Além disso, os corpos cetônicos poderiam levar à modulação da sinalização do receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), do receptor 2 do ácido hidróxi-carboxílico (HCA2), à redução da concentração das citocinas inflamatórias: fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-1 (IL-1) e interleucina-6 (IL-6) e da ativação do domínio pirina contendo 3 da família de receptores semelhantes a NOD (NLRP3) inflamassoma que poderiam provocar efeitos benéficos contra o câncer. Entretanto, o mesmo artigo informa que os dados ainda não parecem ter a robustez necessária para mostrar uma melhora na morbidade ou mortalidade por câncer ou permitir identificar qual tipo de câncer poderia ser mais responsivo à DC (MUNDI et al, 2021).

1.2 Impacto da Dieta Cetogênica na Inflamação e Oxidação

A DC e os corpos cetônicos têm sido associados a efeitos anti-inflamatórios pela redução de citocinas como o fator de necrose tumoral α (TNF- α), IL-1 e IL-6 (MUNDI et al, 2021). Estudo em um modelo experimental de câncer de cólon mostrou diminuição na concentração de IL-6 (NAKAMURA et al, 2018). Embora não esteja totalmente estabelecido, o aumento na concentração de β -hidroxibutirato (BHB) parece reduzir a severidade de doenças inflamatórias como a síndrome de Muckle-Wells, a síndrome autoinflamatória familiar pelo frio e a peritonite induzida por cristais de urato, todas mediadas pelo NLRP3 inflamassoma de macrófagos (YOUM et al, 2015). O artigo de JENSEN e colaboradores (2020) propõe um efeito benéfico do BHB no ciclo vicioso da

crise energética na doença degenerativa, demonstrando uma inibição do estresse oxidativo, da neuroinflamação e da disfunção mitocondrial junto com a oxidação facilitada de corpos cetônicos e uma restauração parcial do metabolismo (**Figura 2**).

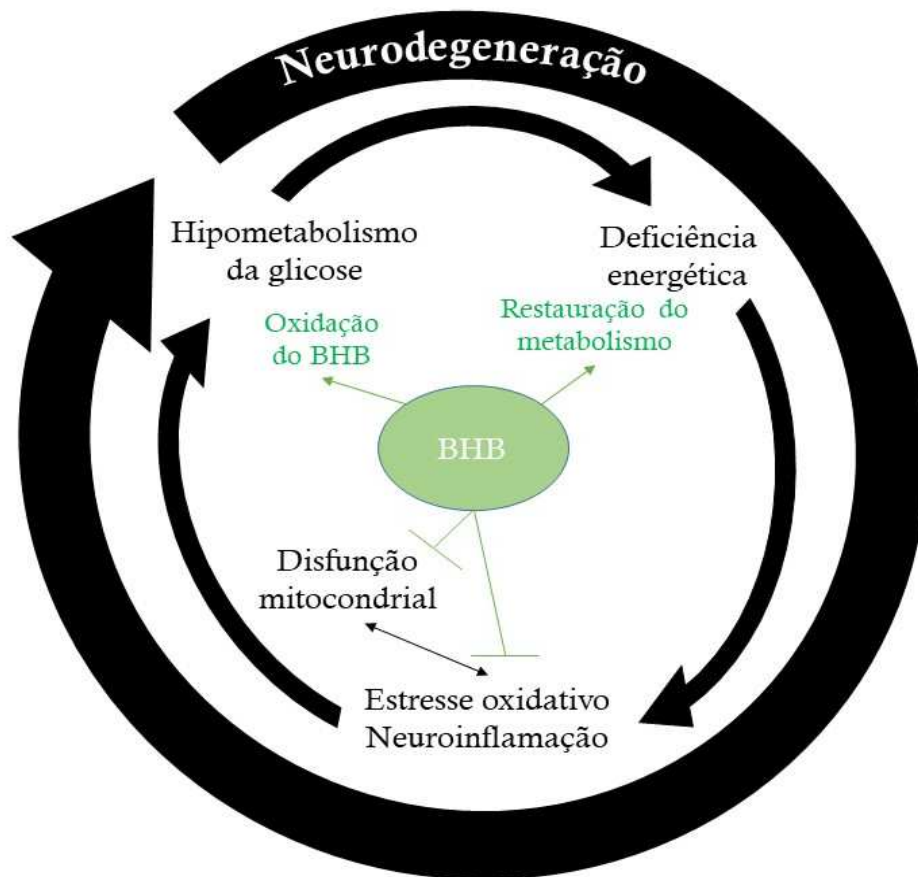


Figura 2 – Ciclo vicioso da crise energética degenerativa. Adaptada de JENSEN et al, 2020.

De modo contrário, o elevado conteúdo de ácidos graxos saturados presente na DCC tem sido considerado promotor de efeitos inflamatórios em vários estudos e condições clínicas. Para MILANSKI et al (2009), esse efeito pró-inflamatório é mediado pela ativação da sinalização do receptor tipo Toll 4 (TLR4) no hipotálamo. Seu estudo experimental com animais obesos mostrou que, além da expressão de citocinas inflamatórias, a ativação da sinalização do TLR4 produz estresse do retículo endoplasmático e aumento da resistência ao efeito anorexígeno da leptina e da insulina no hipotálamo. Em um estudo *in vitro* com cultura de astrócitos, GUPTA e colaboradores (2012), mostraram que os ácidos graxos saturados palmítico, láurico e esteárico estimularam a secreção das citocinas inflamatórias TNF- α e IL-6, principalmente via

ativação de TLR4, enquanto o ácido graxo ω -3, do tipo docosahexaenóico (DHA) teria um efeito protetor em relação ao ácido palmítico.

A inflamação também pode ser estimulada pelos ácidos graxos saturados por meio da ativação do NLRP3 no inflamassoma de macrófagos. O estudo *in vitro* analisou o efeito do tratamento de macrófagos humanos com os ácidos palmítico, esteárico e oleico na ativação do NLRP3. Os resultados mostraram que, ambos os ácidos graxos saturados estimularam a produção de IL1- β . De modo oposto, o ácido oleico não promoveu aumento do NLRP3 e quando combinado ao ácido palmítico foi capaz de inibir a inflamação induzida por esse ácido graxo saturado (GIANFRANCESCO et al, 2019). Considerando as funções metabólicas dos ácidos graxos poli-insaturados, uma dieta com 50% das calorias fornecidas por lipídios, dos quais 20% eram óleo de soja, induziu maior expressão de NF-kB no hipotálamo, um potente fator de transcrição de citocinas pró-inflamatórias, quando comparado a uma dieta com 50% das calorias fornecidas por lipídios, dos quais 20% eram óleo de peixe. Os autores associaram a esse efeito uma possível interferência no mecanismo de regulação do apetite que teria levado os animais alimentados com a dieta rica em óleo de soja a níveis maiores de massa corporal (PIMENTEL et al, 2013).

Os ácidos graxos ω -3 vêm sendo estudados por vários autores em diversas situações de saúde e de doença. CALDER (2015) destacou os efeitos anti-inflamatórios dos ácidos graxos ω -3, ácido eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA), obtidos a partir do óleo de peixes marinhos. O papel anti-inflamatório dos ácidos graxos ω -3 é resultante da ativação de diversas vias, dentre as quais se destacam a produção de eicosanoides e docosanoides menos potentes do ponto de vista inflamatório, como as prostaglandinas da série 3 e leucotrienos da série 5, a redução da expressão da enzima ciclooxigenase-2 (COX2), da expressão do NF-kB, a inibição da produção de citocinas inflamatórias como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8, bem como redução da síntese de metaloproteinases de matriz (CALDER, 2008). A redução da expressão da COX2 e do NF-kB pode estar ligada por exemplo, ao aumento da produção da neuroprotectina D1 (NPD1), um potente autacoide docosanoide modulador de vias de sinalização que promovem a sobrevivência celular, produzido a partir do DHA no encéfalo (BAZAN, 2005).

Além disso, é importante notar que, de todos os órgãos do corpo humano, a exceção do tecido adiposo, o Sistema Nervoso Central (SNC) tem o mais alto conteúdo lipídico, cerca de 60% do seu peso seco. Desse conteúdo, 30% consiste em ácidos graxos

poli-insaturados (PUFAs) (TAHA et al, 2010). Por exemplo, PUFAs como o ácido araquidônico (AA, 20:4 ω 6), DHA (22:6 ω 3), EPA (20:5 ω 3), e ácido γ -linolênico (18:3 ω 6) são componentes estruturais e funcionais do cérebro (SILVA-SANTI et al, 2018). O DHA é, quantitativamente, o mais importante PUFA da série ω -3 no cérebro e parece ter funções únicas e indispensáveis na membrana neuronal (DYALL, 2015). Estudos em animais têm demonstrado o efeito positivo dos PUFAs ω -3 em parâmetros metabólicos (atividade antioxidante) e comportamentais (funções cognitivas, na aprendizagem relacionada à memória) e no aumento da neuroplasticidade cerebral (ABDEL-WAHAB et al, 2015).

Embora o estresse oxidativo, assim como a resposta inflamatória, seja um mecanismo de defesa natural das células que pode levar à destruição de patógenos, o desequilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio (ROS) como o íon superóxido (O_2°), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (HO°) e os mecanismos antioxidantes como as enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPx), Tiorredoxina (Trx) e Peroxirredoxinas (Prxs), pode estar relacionado à exacerbação do processo inflamatório e ao início ou agravamento de diversas doenças neurológicas (SIES e STAHL, 1995, MATÉS et al, 1999). As enzimas antioxidantes neutralizam moléculas com potencial de gerar ROS e substâncias reativas de nitrogênio (RNS) capazes de provocar reações em cadeia gerando mais espécies que podem levar até a morte celular (PUTTACHARY et al, 2015; IGHODARO e AKINLOYE, 2018). De modo mais detalhado, o fluxo das reações bioquímicas de ROS/RNS, seu efeito nas estruturas celulares e sua eliminação por antioxidantes endógenos e exógenos está esquematizado na **Figura 3**. A enzima NADPH oxidase (NOX) é a principal fonte enzimática de ROS. A NOX reduz o oxigênio a ânion superóxido (O_2°), que depois é reduzido a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em uma reação catalisada pela SOD. O radical hidroxila (OH°), o mais reativo entre seu grupo e que é produzido através da reação de Fenton sobre o H_2O_2 , leva à peroxidação lipídica ao produzir metabólitos prejudiciais como o malondialdeído (MDA) e o 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE), que provocam disfunção mitocondrial e morte celular. O H_2O_2 também pode reagir com o dióxido de nitrogênio (NO_2) e produzir dióxido nítrico reativo ($^{\circ}NO_2$), com o cloro (Cl) e produzir o ácido hipocloroso ($HOCl^{\circ}$), e com o fenol (Ph), produzindo o radical fenoxi (PhO°) que são extremamente tóxicos e oxidantes, promovem oxidação em lipídios e proteínas, podendo levar à ruptura das junções intercelulares e aumentar a permeabilidade paracelular, em um processo que pode levar à morte celular. O H_2O_2 é eliminado pela

CAT, nos peroxissomos, e pela GPx em diversos tecidos. Nas mitocôndrias, na presença das enzimas GPx e CAT, o H_2O_2 é convertido em água e oxigênio. A GPx oxida a glutatona (GSH) em glutatona oxidada (GSSG) e a Glutaciona redutase (GSHred) recicla a GSH a partir do GSSG. O NADPH é reduzido a NADP pela GSHred. A razão GSH/GSSG é um biomarcador de estresse oxidativo comumente usado em sistemas biológicos. No entanto, a GPx também catalisa H_2O_2 em H_2O usando TRXred reduzido. A defesa antioxidante contra intermediários tóxicos de oxigênio compreende uma rede intrincada que é fortemente influenciada pela nutrição (vitaminas A, E, C e ácidos graxos). O sistema cotransportador cistina/glutamato (CGS) desempenha um papel importante no metabolismo da glutatona e atua como antioxidante em células gliais, como os astrócitos. A cisteína oxidada extracelular é reduzida a cisteína pela tiorredoxina redutase ou glutatona que ajuda a manter o equilíbrio do estado estacionário entre antioxidantes e ROS. Por sua vez, o $O_2^{\cdot-}$ pode reagir com o óxido nítrico (NO), o que resulta na formação do peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$), no citoplasma, levando ao aumento da produção de ROS, oxidação de DNA, RNA e proteínas, disfunção do canal iônico e perda de NO bioativo. O $ONOO^{\cdot}$ inativa a Mn-SOD, aumentando assim o fluxo de ânions superóxido disponíveis para reagir com o NO (PUTTACHARY et al, 2015).

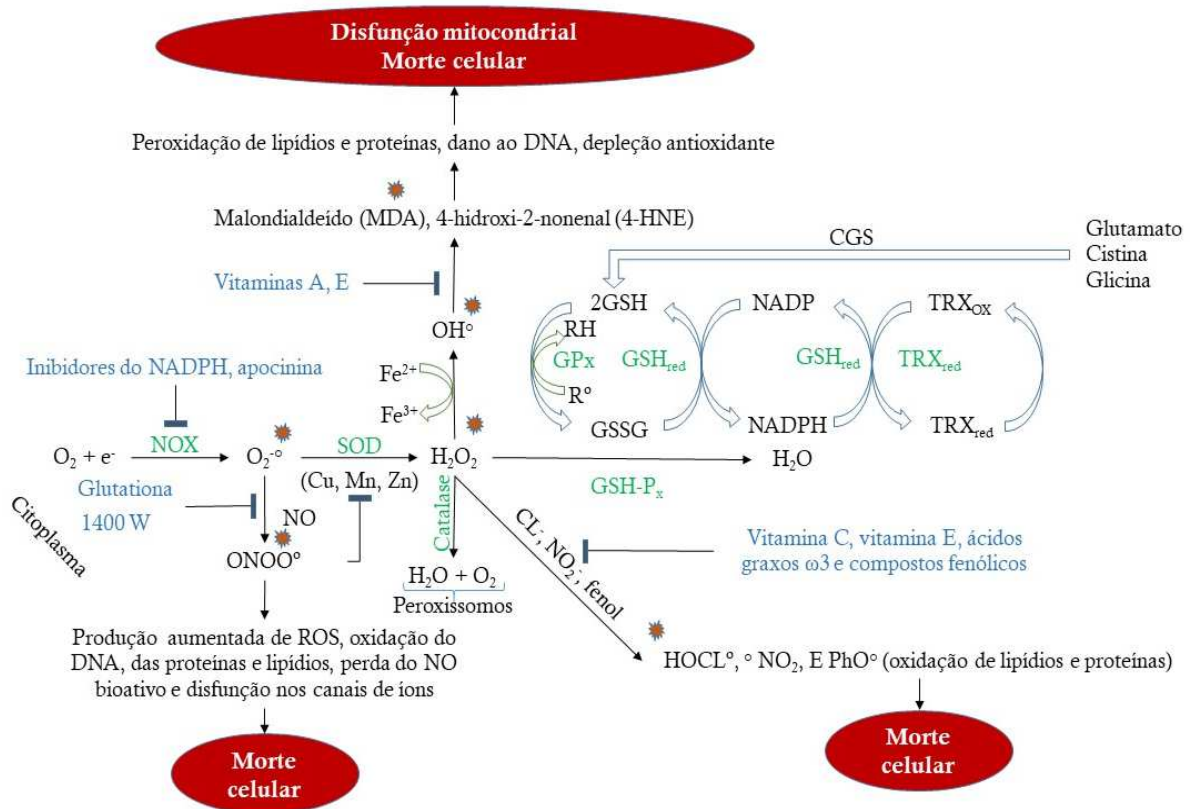


Figura 3 - Reações bioquímicas de ROS/RNS e sua eliminação por antioxidantes endógenos celulares. Os componentes em azul representam antioxidantes não enzimáticos, o verde representa enzimas oxidativas e antioxidantes e um pequeno sinal vermelho de explosão representa a geração de substâncias reativas de oxigênio ou nitrogênio. ROS, espécies reativas de oxigênio; NADPH, nicotinamida adenina fosfato de dinucleotídeo; NOX, NADPH oxidase; SOD, superóxido dismutase (Cu/Zn – cobre/zinco, Mn – manganês); CAT, catalase; O₂^{•-}, ânion superóxido; H₂O₂, peróxido de hidrogênio; NO, óxido nítrico; ONOO[•], peroxinitrito; HOCl[•], ácido hipocloroso; PhO[•], radical fenoxi; OH[•], radical hidroxila; GSH, glutationa; GSSG, glutationa oxidada; TRXox/red, tiorredoxina oxidada e reduzida; TRXred, tioredoxina redutase; GSHred, glutationa redutase; GPx, glutationa peroxidase; CGS, sistema cotransportador de cistina/glutamato. Adaptada de PUTTACHARY et al, 2015.

Em 2015, os pesquisadores definiram o Nrf2 como regulador máster da resposta antioxidante. Esse fator, cuja expressão e ativação são diretamente moduladas pelo estresse oxidativo e pela inflamação, também tem mostrado ação importante na ativação de mais de doze genes envolvidos na detoxificação de vários agentes xenobióticos além da diminuição da resposta inflamatória e da regulação da resposta antioxidante citada anteriormente (PALL e LEVINE, 2015). Portanto, o papel da DC na modulação da inflamação e oxidação é fortemente dependente da composição de ácidos graxos presentes em sua composição.

1.3 Impacto da Dieta Cetogênica no Comportamento e Atividade Cerebral

Aprendizagem, memória e ansiedade são características da cognição e do comportamento que podem ser mensuráveis em estudos experimentais. No tocante à aprendizagem e à memória, dois testes costumam ser aplicados em ratos: o teste de Reconhecimento de objetos e teste de Medo ao contexto. No teste de reconhecimento de objetos, os animais são expostos a dois objetos diferentes no primeiro dia, os objetos A e B. No segundo dia, troca-se o objeto B pelo objeto C. Espera-se que o animal reconheça e lembre-se do objeto A, apresentando menos interesse em explorá-lo e que tenha mais interesse pelo novo objeto, o objeto C (ENNACEUR e DELACOUR, 1988). Já no teste de medo ao contexto, o animal é colocado em um novo ambiente (contexto) e, após explorar esse novo contexto por algum tempo, o animal sofre um estímulo aversivo (choque após um som intenso). No dia seguinte, ao ser submetido novamente ao novo contexto, quantifica-se o número de paradas comportamentais, caracterizadas pela ausência de movimentos exceto da respiração (*freezing*) que poderia refletir sua capacidade de memória e de associação do novo ambiente ao estímulo aversivo. Há ainda

um terceiro dia, em que o animal é submetido a um novo contexto, diferente daquele dos dias anteriores e recebe o estímulo sonoro por duas vezes, para se observar o quanto o animal é capaz de associá-los ao choque quantificando-se pelo número de *freezings* (CURZON et al, 2009).

Quando se considera a ansiedade, segundo o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-5), os transtornos de ansiedade incluem transtornos que compartilham características de medo e ansiedade excessivos e perturbações comportamentais relacionados. Medo é a resposta emocional a ameaça iminente real ou percebida, enquanto ansiedade é a antecipação de ameaça futura. Obviamente, esses dois estados se sobrepõem, mas também se diferenciam, com o medo sendo com mais frequência associado a períodos de excitabilidade autonômica aumentada, necessária para luta ou fuga, pensamentos de perigo imediato e comportamentos de fuga, e a ansiedade sendo mais frequentemente associada a tensão muscular e vigilância em preparação para perigo futuro e comportamentos de cautela ou esquivia (APA, 2014). Medir a ansiedade em testes experimentais é uma prática considerada útil para se obter informações relativas a tratamentos medicamentosos, intervenções nutricionais e comparações em casos de doença. Um dos testes mais comuns de medida da ansiedade em ratos e camundongos é o teste do Labirinto em Cruz Elevado. O teste baseia-se no conflito entre uma aversão inata a espaços expostos e a tendência a explorar novos ambientes (COHEN et al, 2013). Os ratos tendem a preferir os espaços fechados, com menor risco de predadores. Entretanto, esse receio pode ser exacerbado e ser interpretado como ansiedade (LEZAK et al, 2017). De modo semelhante, o teste de campo aberto é frequentemente usado para avaliar a ansiedade e a atividade locomotora dos animais e é realizado em uma caixa circular ou retangular aberta em cima com níveis de ansiedade inferidos pela latência para entrar e o tempo gasto no centro da arena, onde o sujeito estaria hipoteticamente mais vulnerável a predadores (LEZAK et al, 2017). O teste de campo aberto ainda fornece informações relativas à autolimpeza e à defecação dos animais (WALSH e CUMMINS, 1976).

Os efeitos da DC sobre a cognição e o comportamento vem sendo investigados, uma vez que é fundamental garantir o crescimento e o desenvolvimento adequados em crianças que necessitam se submeter a esse tratamento. Um estudo randomizado controlado encontrou impacto positivo da DC em crianças e adolescentes com epilepsia refratária, medindo esse efeito com questionários com os cuidadores e com testes psicológicos feitos pelos indivíduos quatro meses após o início da dieta. Os pesquisadores

não detalharam a composição da DC. Ainda assim, o grupo da DC mostrou menores níveis de ansiedade e distúrbios de humor, além de ter se mostrado mais produtivo em relação ao grupo que foi tratado de maneira usual (IJFF et al, 2016). Além disso, uma revisão investigou o papel da DC e sua relação com a memória, a epilepsia e o sono. Os autores citam o potencial da DC em promover melhora cognitiva na memória em pacientes com DA e melhora da qualidade do sono em pacientes com epilepsia talvez por mecanismo que envolva também a maior produção de GABA. Eles citam como limitação do estudo, o fato de a DC ter diferentes perfis de composição, a exemplo dos diferentes tipos que já citamos, além de outras modificações pontuais (HALLBÖÖK et al, 2012). Outra revisão mais recente cita efeitos positivos da DC sobre a ansiedade e a depressão pela modulação da atividade do glutamato ligada ao efeito anti-inflamatório dos corpos cetônicos em indivíduos com esclerose múltipla. Entretanto, os autores advertem para o que chamaram de monitoramento da resposta individual revelando preocupação com itens secundários como constipação, náusea, vômitos, diminuição do apetite e dislipidemia transitória (ORTÍ et al, 2023). Por outro lado, alguns estudos experimentais têm relatado o impacto negativo da DC nesses parâmetros. Em um desses estudos, ratos Sprague-Dawley machos com 20 dias de idade, tratados com DC com 78,8% de gorduras, rica em gorduras saturadas, cujas fontes foram banha (47,5%), manteiga (19,95%) e óleo de milho (11,4%), após indução de epilepsia pelo método lítio-pilocarpina, apresentaram comprometimento grave da memória visual-espacial e diminuição do crescimento cerebral. Entretanto, os autores afirmam que alguns efeitos negativos poderiam ser explicados pelo fato da DC ter atingido apenas 9,4% de proteínas (ZHAO et al, 2004), quando as recomendações da AIN-93 estabelecem que durante a fase de crescimento os animais precisam de 17% de proteínas e para manutenção de animais adultos seria necessário atingir cerca de 12% de proteínas (REEVES et al, 1993). Em outro estudo, observou-se que camundongos C57Bl/6 machos com 12 meses de idade que receberam uma dieta com 60% de gorduras (9,26% de óleo de soja e 90,74% de banha de porco), apresentaram prejuízo cognitivo, medido no teste do labirinto em T em relação ao grupo controle que consumiu uma dieta com 10% de gorduras. PISTELL e colaboradores (2010), associaram esse efeito à inflamação cerebral, já que o grupo da dieta hiperlipídica também apresentou valores mais expressivos de TNF- α , IL-6 e MCP-1, além de menor concentração do Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF). De maneira diversa, de acordo com WŁODARCZYK e colaboradores (2020), a DC associada ao uso de probióticos pode exercer um papel ansiolítico, de redução da ansiedade, por meio da ação

anti-inflamatória e antioxidante dos corpos cetônicos. Além de proporem um gráfico com os mecanismos dessa ação ansiolítica, os autores também chamam a atenção aos possíveis benefícios de determinados ácidos graxos em relação à ansiedade, especialmente dos ácidos graxos $\omega 3$ EPA e DHA (**Figura 4**).

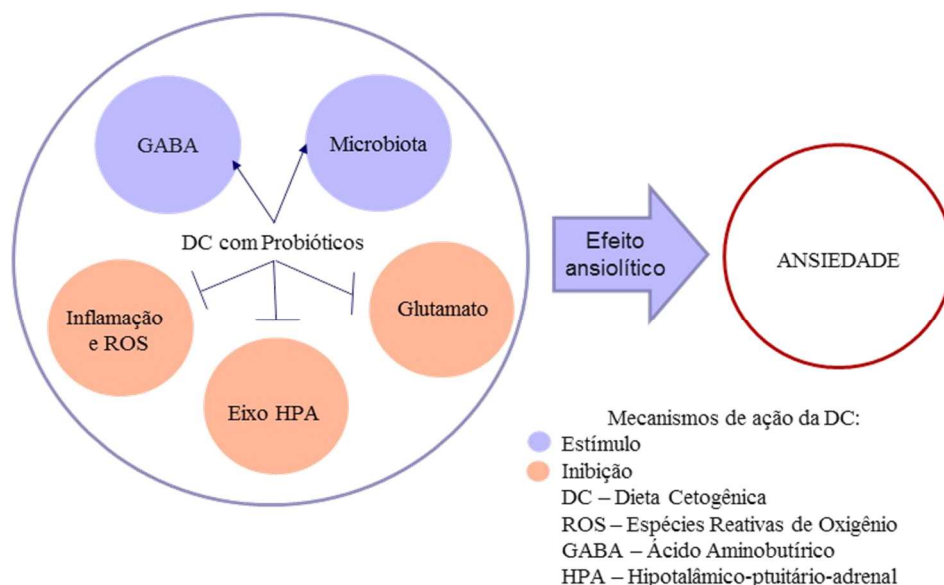


Figura 4. Mecanismos de ação do efeito ansiolítico da DC associada a probióticos. Adaptada de WŁODARCZYK et al, 2020.

A relação específica dos ácidos graxos com a cognição e o comportamento também tem sido observada. Um estudo que confronta dietas enriquecidas com diferentes fontes lipídicas demonstrou melhora no desempenho cognitivo de ratos Sprague-Dawley com três semanas de idade no teste do labirinto aquático de Morris, assim como se observou maior expressão gênica de PPAR- α e PPAR- γ no hipocampo dos animais. Os pesquisadores enriqueceram a dieta padrão de 3 maneiras diferentes, uma foi enriquecida com 7% de manteiga e ficou com a relação $\omega 6/\omega 3$ em 64,25, outra, foi enriquecida com 1% de óleo de peixe e 6% de óleo de soja e ficou com a relação $\omega 6/\omega 3$ em 20,92 e uma terceira, enriquecida com 3,5% de óleo de peixe e 3,5% de óleo de soja, que ficou com a relação $\omega 6/\omega 3$ em 4,47. As dietas não eram cetogênicas, mas a ideia dos pesquisadores era avaliar a influência dos diferentes tipos de ácidos graxos acrescentados. As dietas com menor relação $\omega 6/\omega 3$ apresentaram resultados positivos em relação à cognição e à expressão dos Receptores ativados por proliferadores de peroxissomos (PPARs) (HAJJAR et al, 2012).

A fluordeoxiglicose (FDG 18-F) pode funcionar como um marcador do efeito da cetose sobre metabolismo da glicose no cérebro. Um estudo recente comparou o consumo de diversas áreas do cérebro de FDG 18-F com as concentrações de glicose e de corpos cetônicos plasmáticos. Os pacientes consumiram a DC por 2 dias, seguido por jejum de 18h. A cetose foi determinada pelo teor sanguíneo de BHB (≥ 0.5 mmol/L) antes da injeção de FDG 18-F. Os autores afirmaram que concentrações elevadas de corpos cetônicos no sangue podem inibir a captação de FDG 18-F em todo o cérebro, e, mais marcadamente, no precuneus - região do lobo parietal. Eles concluíram que a captação cerebral de FDG 18-F pode ser afetada pela glicemia e pela cetonemia. A magnitude variável deste efeito entre diferentes regiões cerebrais deve ser levada em conta ao se fazer a seleção da região cerebral apropriada para a normalização do SUV, particularmente ao se realizar comparação de bancos de dados na avaliação da demência (BENNETT et al, 2022).

Considerando os efeitos mentais, emocionais e comportamentais da DC em outras condições neuropsiquiátricas, a revisão de GRIGOLON e seus colaboradores (2022) elencou vários efeitos benéficos da DC em animais e em humanos. Aliando a essas observações tudo que expusemos nos estudos anteriores, propusemos a montagem de uma tabela que sumariza efeitos benéficos e efeitos adversos da DC e que pudesse nortear o que se propõe neste trabalho (**Tabela 1**).

Tabela 1 – Potencias efeitos benéficos e efeitos adversos da DC.

Efeitos benéficos da DC	Efeitos adversos da DC
↑ GABA	Desidratação
↓ Incidência e severidade de crises epiléticas	Hipoglicemia transitória
↓ Ramificação microglial	Halitose
↓ disfunções neurodegenerativa e cognitiva no início da DA	Náuseas
↓ Disfunção mitocondrial	Vômitos
↓ mTORC1 no hipocampo	Diarreia
↓ Consumo alimentar e da fome	Constipação
↓ Neuroinflamação	Hiperuricemia
↓ Ansiedade	Hipoproteinemia
↓ Depressão	Hipocalcemia com dano ósseo
↓ Perda de coordenação motora na ELA	Urolitíase
↓ Disponibilidade de glicose para as células tumorais	Cálculos biliares
↓ Citocinas inflamatórias	Alopecia
↓ NLRP3 inflamassoma	Alterações negativas no tamanho e no fenótipo das lipoproteínas
↓ Severidade de doenças inflamatórias como a síndrome de Muckle-Wells, a síndrome autoinflamatória familiar pelo frio e a peritonite induzida por cristais de urato	↑ LDL-c
↓ Crescimento tumoral	↓ HDL-c
Proteção das células saudáveis dos danos da quimioterapia e da radiação	↓ folato, vitamina C e magnésio
Melhora nos sintomas do TDAH	↑ Citocinas inflamatórias (ácidos graxos saturados palmítico, láurico e esteárico)
↑ Função cognitiva	↑ ativação de TLR4 (ácidos graxos saturados palmítico, láurico e esteárico)
↑ Autofagia prevenindo e controlando desordens neurológicas	↑ Comprometimento da memória visual-espacial (gordura saturada)
↑ Comportamento motor	↓ Tamanho do cérebro (gordura saturada)
↑ Comportamento social no espectro autista	↑ Ansiedade (gordura saturada)
↑ Função social	↑ Cognição e expressão de PPARs (ácidos graxos ω3)
↑ Componentes mentais da qualidade de vida	
↑ Qualidade do sono	
↑ Memória de trabalho	

GABA – Ácido γ -aminobutírico. DA – Doença de Alzheimer. mTORC1 – Complexo 1 do alvo da rapamicina em mamíferos. ELA – Esclerose Lateral Amiotrófica. TDAH – Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade. TLR4 – Receptor tipo Toll 4. PPARs - Receptores Ativados por Proliferadores de Peroxissomos.

2. JUSTIFICATIVA

A dieta cetogênica vem sendo utilizada com relativo sucesso no controle de crises epilépticas e vem conquistando espaço, ainda controverso, como tratamento adjuvante de outras doenças neurológicas, metabólicas, incluindo as doenças cardiovasculares, diabetes, obesidade e o câncer. Sua utilização para redução do peso corporal, embora ainda controversa, também tem se ampliado.

Nossa motivação para a realização deste estudo teve por base a história e as evidências científicas da eficácia clínica do uso da DCC no manejo clínico das epilepsias e nossa experiência na otimização da DC por meio da modulação dos ácidos graxos e consequente potencial de redução dos efeitos adversos sem perda na eficácia clínica.

Até a presente data não há evidências que suportem a aplicação da DCC e DCM em outras doenças e nem no contexto da saúde, pois o conjunto de ácidos graxos saturados, típicos da DCC, são potentes agentes na indução da inflamação, oxidação e resistência à insulina. Contrapõem-se a esse cenário, vários estudos que mostram os benefícios dos ácidos graxos mono e poli-insaturados devido ao seu potencial menos oxidativo, inflamatório e aterosclerótico. Assim, é plausível que uma DCM com maior proporção de ácidos graxos mono e poli-insaturados e enriquecida com ω -3 promova menos complicações inflamatórias e oxidativas, levando a um menor impacto sistêmico e, sobretudo, no sistema nervoso central, onde a homeostase das vias inflamatórias e oxidativas podem interagir com o comportamento.

3. HIPÓTESE

A maior incorporação de ácidos graxos mono e poli-insaturados, incluindo o DHA às membranas das células do sistema nervoso, administradas a partir do consumo de uma DCM, poderia minimizar os efeitos adversos associados ao comportamento e aos marcadores inflamatórios e oxidativos, induzidos por uma DCC, rica em ácidos graxos saturados.

4. OBJETIVOS

4.1 Geral

Avaliar o potencial efeito protetor de uma DCM, rica em MUFAS e PUFAs e suplementada com DHA, sobre a neuroinflamação e o estresse oxidativo e suas repercussões no comportamento de ratos.

4.2 Específicos

- I – Desenvolver e produzir as DCC e DCM.
- II – Avaliar o impacto da DCC e da DCM no crescimento e desenvolvimento dos animais.
- III – Investigar a incorporação dos ácidos graxos no lobo frontal e no hipocampo.
- IV – Mensurar o efeito das DCC e DCM na resposta de marcadores inflamatórios e da homeostase redox e de danos oxidativos.
- V – Avaliar o impacto das DCC e DCM no comportamento.

5. METODOLOGIA

O presente estudo está inserido no estudo principal “Dieta cetogênica e Epilepsia: Uma abordagem nutricional focada na modulação morfofuncional do eixo cérebro-intestino e seus aspectos lipídicos, oxidativos e inflamatórios” financiado pela FAPESP (Proc. 2020/03529-6 – **Anexo 1**) e foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CEUA-FMUSP) (**Anexo 2**).

5.1 Delineamento experimental

A amostra foi composta por 18 ratos da espécie Wistar, machos, adultos jovens, com cerca de 7 semanas, e com peso variando de 200 a 250 gramas. Os animais foram distribuídos considerando-se o pareamento pelo peso corporal, em 3 grupos, de acordo com o tipo de dieta que receberam (**Figura 5**).

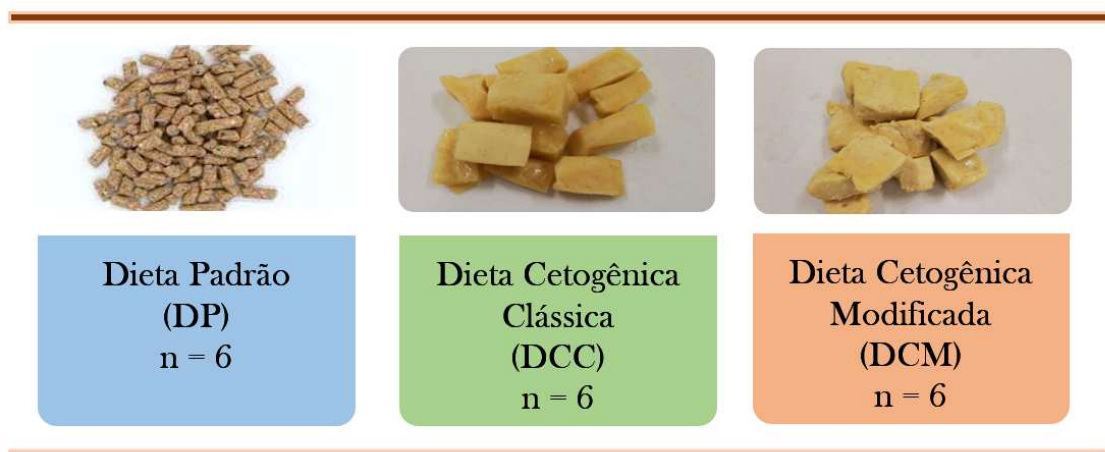


Figura 5. Grupos experimentais DP, DCC e DCM.

5.2 Dietas

A água e a ração foram oferecidas *ad libitum*. Os animais foram mantidos em ciclo luz/escuro de 12h e foram distribuídos aos pares em gaiolas apropriadas em biotério com temperatura controlada em torno de 22°C, visando garantir o efeito ninhada e as condições de bem-estar animal.

Para este estudo, foram desenvolvidos dois tipos de rações, representando a dieta cetogênica clássica (DCC), rica em fontes de gorduras animais e, conseqüentemente, em

ácidos graxos saturados e colesterol, e a dieta cetogênica modificada (DCM), composta prioritariamente por gorduras vegetais, ricas em ácidos graxos monoinsaturados e poli-insaturados. A DCM foi ainda enriquecida com um suplemento de ácidos graxos ω -3, especialmente o DHA, obtido a partir do óleo de peixe. Para promover a adaptação gradativa dos animais às rações foram produzidas rações com diferentes proporções de gorduras para proteínas e carboidratos (1:1, 2:1 e 4:1). As rações foram elaboradas a partir do padrão AIN-93 para crescimento de roedores como referência (REEVES et al, 1993). Mantivemos os mesmos percentuais desse padrão em relação ao conteúdo de fibras, minerais, da L-cistina, da colina e da tert-butil-hidroquinona (BHA).

Em relação à fonte proteica, representada no padrão AIN-93G pela caseína, optamos por substituí-la pela ovoalbumina, uma vez que, nos estudos prévios do grupo, essa proteína conferiu melhor estrutura e maleabilidade dietética à formulação final. Como fonte de ovoalbumina, foi adquirida a clara de ovo em pó (P. R. Netto Indústria de Alimentos Ltda., São Paulo-SP).

Como principal fonte de carboidratos foi utilizada a farinha de amendoim (Geração Saúde® Ltda., Bento Gonçalves-RS). No caso das rações de transição, 1:1 e 2:1, além de ter sido mantida a mesma quantidade de farinha de amendoim da dieta 4:1, utilizamos o amido de milho Yoki® (Yoki Distribuidora de Alimentos Ltda., Cajamar-SP), para complementar a quantidade necessária de carboidratos para a distribuição calóricas nas proporções 1:1 e 2:1.

As fontes de lipídios sofreram variações entre as formulações. Na DCC, as fontes utilizadas foram o óleo de soja Liza® (Liza Comércio de Alimentos Ltda., Belo Horizonte-MG), a banha de porco Frimesa® (Frimesa Cooperativa Central, São Paulo-SP), a manteiga Italac® (Goiasminas Indústria de Laticínios Ltda., Girua-RS) e o óleo de coco Copra® (Copra Indústria Alimentícia Ltda., Maceió-AL). Na DCM, as fontes de lipídios foram o azeite de oliva extra virgem Cocinero® (Camil Alimentos AS, São Paulo-SP), o óleo de girassol Liza® (Liza Comércio de Alimentos Ltda., Belo Horizonte-MG), o óleo de linhaça Pazze® (Pazze Indústria de Alimentos Ltda., Panambi-RS), a banha de porco Frimesa® (Frimesa Cooperativa Central, São Paulo-SP), o óleo de coco Copra® (Copra Indústria Alimentícia Ltda., Maceió-AL), e o suplemento de ácidos graxos ω -3, com cerca de 90% de DHA, o Omegapure® DHA (Biobalance Farma Ltda., Porto Feliz-SP).

A empresa “Prag Solutions”, especializada em rações e produtos para rações animais (Domeneghetti & Correia Ltda., Jaú-SP) forneceu a L-cistina, o bitartarato de

colina, o mix de minerais AIN 93 G, o mix de vitaminas AIN 93 G e o fosfato de potássio. As rações foram enriquecidas com o fosfato de potássio, uma vez que a ovoalbumina não tem a mesma quantidade desse sal que a caseína. O antioxidante BHA foi fornecido pela Labsynth produtos para laboratório Ltda., com sede em Diadema-SP.

Em relação ao conteúdo de vitaminas, considerando o alto potencial de oxidação das rações devido ao seu conteúdo lipídico, à possibilidade de perdas pelo processamento e ao fato de ter havido um consumo menor da ração em gramas, durante o período de teste de aceitação da dieta, utilizamos o dobro da recomendação do padrão AIN-93 G.

A celulose foi fornecida pela empresa Minérios Ouro Branco, de São Paulo-SP.

As rações foram produzidas no Laboratório e Cozinha Didática de Procedimentos e Técnicas Culinárias Aplicadas à Nutrição da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo. A maior parte dos ingredientes foi pesada na Balança digital com 100 mg de precisão e limite de capacidade de 4200g Shimadzu® UX4200H (Shimadzu do Brasil, Barueri-SP). Ingredientes com menor quantidade, como o DHA e o BHA foram pesados na Balança Analítica com precisão de 1mg e limite de capacidade de 220g Shimadzu®, AUY220 (Shimadzu do Brasil, Barueri-SP). Em seguida, os ingredientes foram misturados com ajuda de um liquidificador Philco® PH 900 (Philco Eletrônicos AS, Manaus-AM) lentamente, seguindo uma sequência específica. A preparação foi então levada ao forno elétrico (Layr Luxo 2400W, Layr Eletrodomésticos, São Paulo-SP) em temperatura em torno de 100°C por 20 a 30 minutos. Depois de esfriar, foi então cortada em cubos de, aproximadamente, 2,0cm de largura e 1,0cm de espessura. As rações foram congeladas para que pudessem ser levadas ao liofilizador (*Freeze Dryer Operon*, Korea) por cerca de cinco horas. Após liofilizadas, foram mantidas congeladas até serem pesadas e porcionadas em pacotes selados à vácuo em embalagens de alumínio (Seladora TM 150, TecMaq, São Paulo-SP) e identificados quanto ao tipo de ração, peso líquido e data de empacotamento (**Figura 6 - A**). As rações foram armazenadas congeladas (-30°C) até serem disponibilizadas para consumo pelos animais.

Os animais do grupo Controle consumiram ração comercial para ratos (Nuvilab CR1®).

A ração da DCC ficou com aspecto e consistência bem semelhantes aos da ração da DCM (**Figura 6 - B**). Do ponto de vista organoléptico, a DCC apresentou suave odor e sabor de coco, ao passo que a ração da DCM, apresentou leve odor e sabor de peixe, devido à presença do suplemento de DHA feito a partir do óleo de peixe.

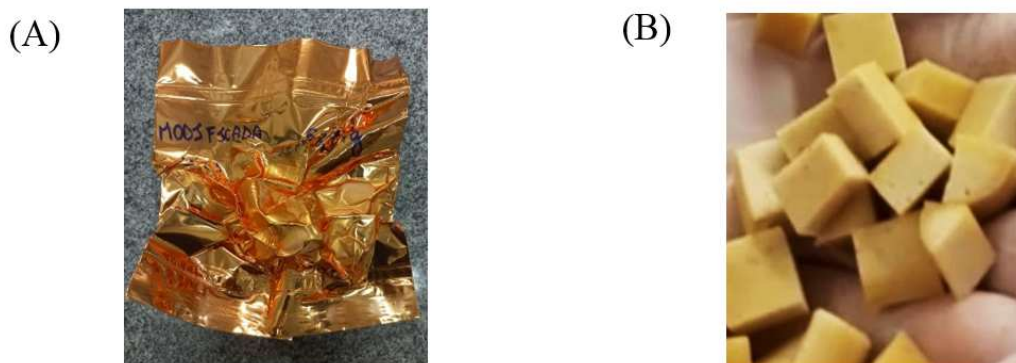


Figura 6 – (A) Exemplo de ração embalada. (B) Aspecto da ração da DCM.

A composição das dietas cetogênicas foi estimada utilizando-se o software *The Food Processor*® (Esha Research, Salem-EUA), que traz tabelas de composição dos Estados Unidos, principalmente da tabela do *United States Department of Agriculture* (USDA). A **Tabela 2** apresenta a composição nutricional teórica em macronutrientes e calorias das três dietas considerando as dietas cetogênicas na proporção 4:1, para fim de comparação com a dieta padrão. Já as **Tabelas 3 e 4** detalham a composição nutricional teórica em proteínas, carboidratos, lipídios, proporções de gorduras, ácidos graxos e a relação ω -6/ ω -3 das diferentes proporções (1:1, 2:1 e 4:1) das dietas DCC e DCM, proporcionando um comparativo da composição e sua evolução até a proporção 4:1.

Tabela 2. Composição nutricional teórica em proteínas, carboidratos, lipídeos e calorias estimadas para cada 100g das dietas DP, DCC 4:1 e DCM 4:1.

Nutrientes (%)	DP*	DCC 4:1	DCM 4:1
Proteínas	22,00	8,94	8,56
Carboidratos	54,00	1,50	1,14
Lipídeos	4,00	89,56	90,30
Calorias	339,00	660,84	691,68

* Dados obtidos do rótulo da embalagem da Ração Nuvilab-CR1®.

Tabela 3. Composição nutricional teórica em proteínas, carboidratos, lipídeos, calorias, proporções de gorduras segundo grau de insaturação, e relação ω -6/ ω -3 estimados para 100g de cada uma das três proporções da DCC.

Nutrientes (%)	DCC 1:1	DCC 2:1	DCC 4:1
Proteínas	14,75	14,77	14,77
Carboidratos	27,12	13,43	2,48
Lipídeos	40,66	54,52	65,76
Calorias	533,42	603,48	660,84
Gorduras Saturadas	16,82	24,35	30,64
C4:0 Ácido Butírico	0,32	0,52	0,65
C6:0 Ácido Capríco	0,24	0,37	0,46
C8:0 Ácido Caprílico	0,57	0,79	0,99
C10:0 Ácido Cáprico	0,63	0,91	1,13
C12:0 Ácido Láurico	2,96	4,02	5,03
C14:0 Ácido Mirístico	1,93	2,80	3,49
C16:0 Ácido Palmítico	6,74	9,87	12,70
C17:0 Ácido Heptadecanóico	0,06	0,09	0,12
C18:0 Ácido Esteárico	3,32	4,92	5,99
C20:0 Ácido Araquídico	0,03	0,04	0,05
C22:0 Ácido Behênico	0,02	0,02	0,03
Gorduras Monoinsaturadas	10,35	14,87	18,08
C16:1(9) ω 7 Ácido Palmitoléico	0,46	0,71	0,86
C17:1 Ácido cis-10-heptadecenóico	0,00	0,00	0,00
C18:1(9) ω 9 Ácido Oleico	9,73	13,93	16,94
C20:1 ω 9 15 Ácido 5-eicosenóico	0,16	0,23	0,28
Gorduras Poli-insaturadas	6,52	7,52	9,27
C18:2(9,12) 6 Ácido Linoleico	5,79	6,70	8,26
C18:3(9, 12, 15) ω 3 Ácido α -linolênico	0,73	0,82	1,01
C20:3(8, II, 14) ω 6 Ácido di-homo- γ -linolênico	0,00	0,00	0,00
C20:5(5,8, 11,14,17) ω 3 EPA	0,00	0,00	0,00
C22:6(4,7,10,13,16,19) ω 3 DHA	0	0	0,00
Relação ω-6 / ω-3	7,93	8,17	8,18

Tabela 4. Composição nutricional teórica em proteínas, carboidratos, lipídeos, calorias, proporções de gorduras, segundo grau de insaturação, ácidos graxos, e relação ω -6 / ω -3 estimados para 100g de cada uma das três proporções da DCM.

Nutrientes (%)	DCM 1:1	DCM 2:1	DCM 4:1
Proteínas	14,87	14,84	14,80
Carboidratos	26,61	13,84	1,97
Lipídeos	42,41	56,41	69,40
Calorias	547,61	603,48	691,68
Gorduras Saturadas	8,27	11,53	14,45
C4:0 Ácido Butírico	0,00	0,00	0,00
C6:0 Ácido Capríco	0,02	0,02	0,03
C8:0 Ácido Caprílico	0,23	0,30	0,38
C10:0 Ácido Cáprico	0,19	0,25	0,32
C12:0 Ácido Láurico	1,35	1,81	2,26
C14:0 Ácido Mirístico	0,61	0,83	1,04
C16:0 Ácido Palmítico	4,12	5,82	7,28
C17:0 Ácido Heptadecanóico	0,01	0,01	0,01
C18:0 Ácido Esteárico	1,64	2,37	2,97
C20:0 Ácido Araquídico	0,07	0,09	0,12
C22:0 Ácido Behênico	0,03	0,03	0,04
Gorduras Monoinsaturadas	15,71	21,75	26,99
C16:1(9) ω 7 Ácido Palmitoléico	0,41	0,58	0,72
C17:1 Ácido cis-10-heptadecenóico	0,02	0,20	0,03
C18:1(9) ω 9 Ácido Oleico	15,15	20,79	26,01
C20:1(15) ω 9 Ácido 5-eicosenóico	0,13	0,18	0,23
Gorduras Poli-insaturadas	6,32	8,67	10,90
C18:2(9,12) 6 Ácido Linoleico	3,11	4,31	5,41
C18:3(9, 12, 15) ω 3 Ácido α -linolênico	3,07	4,22	5,35
C20:3(8, 11, 14) ω 6 Ácido di-homo- γ -linolênico	0,01	0,01	0,01
C20:5(5,8,11,14,17) ω 3 EPA	0,00	0,00	0,00
C22:6(4,7,10,13,16,19) ω 3 DHA	0,13	0,13	0,13
Relação ω-6 / ω-3	0,97	0,99	0,99

5.3 Monitoramento dos Animais

O experimento teve uma duração total de 100 dias divididos em 6 períodos de monitoramento (T0 a T5). A **Figura 7** detalha o fluxo do experimento.

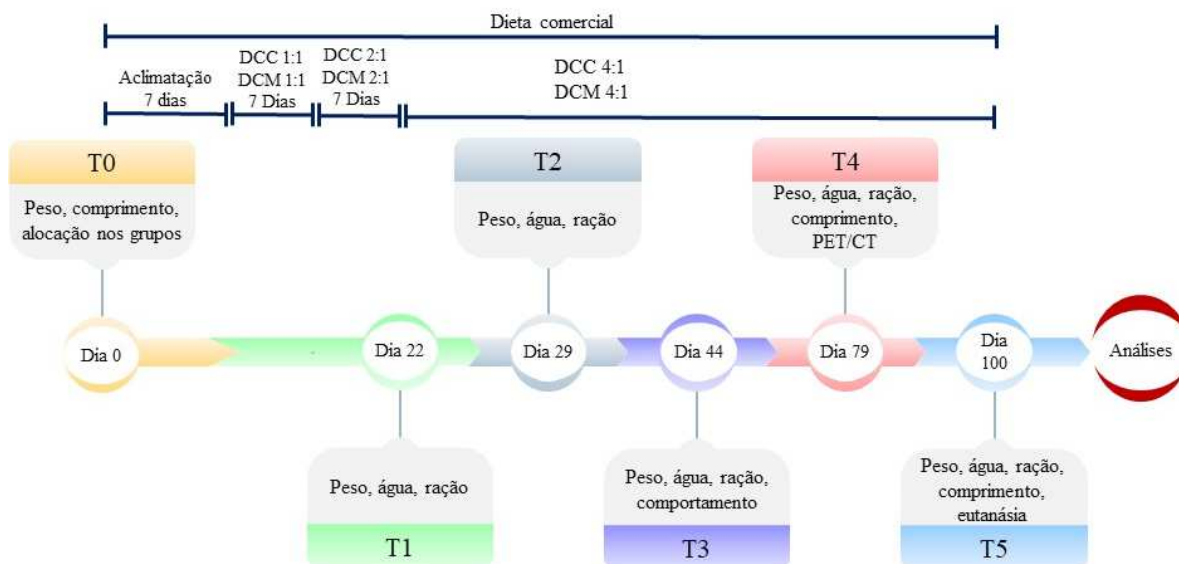


Figura 7. Fluxo do experimento.

5.3.1 Medidas antropométricas e de consumo

O peso dos animais foi monitorado em seis momentos, sendo o primeiro, o tempo basal (T0), caracterizado como o período de aclimação com duração de 7 dias. Após esse período, foram introduzidas as rações 1:1 e 2:1, cada uma oferecida ao longo de um período de 7 dias. Após o início das dietas na proporção 4:1, foram feitas as coletas de peso que aconteceram em outros 5 momentos (T1, T2, T3, T4 e T5), visando avaliar a possível influência dessa variável sobre os demais parâmetros analisados. Para a pesagem dos animais foi utilizada a balança digital SF-400 (Wellmix®), com capacidade de 0,1 g até 10 kg.

O comprimento dos animais foi aferido a partir da fixação de uma régua de 30 cm a uma área plana e lisa. Os animais foram posicionados de modo paralelo à régua, imobilizando-os desde a ponta do nariz até o início da cauda, deixando-os o mais rente possível à mesa. A medição foi realizada em triplicata e em 3 momentos do estudo (T0, T4 e T5).

O monitoramento do consumo das rações e da água foi realizado em 5 momentos (T1, T2, T3, T4 e T5). Para a pesagem das rações foi utilizada balança digital SF-400

(Wellmix®), com capacidade de 0,1 g e limite de 10 kg. Para a avaliação do consumo de água foi utilizada uma proveta com capacidade de 100mL. Cada momento de monitoramento foi representado pela média da coleta de dados de 3 dias consecutivos, sempre realizada no mesmo período do dia.

Após a coleta dos dados de consumo de rações, calorias e feito o cálculo individual de ganho de peso, procedendo-se a subtração do peso do animal em T5 pelo seu peso em T1, foi possível calcular o Coeficiente de Eficácia Alimentar (CEA) e o Coeficiente de Ganho de Peso por Caloria Consumida (CGPCC). Neste estudo, com os animais distribuídos aos pares, fez-se uma divisão simples por dois da quantidade de ração consumida em cada caixa nos momentos de pesagem das rações. Para o cálculo do total de ração consumida, procedeu-se a multiplicação do valor médio encontrado a partir dos resultados nos 5 tempos, multiplicado pelo número de dias do experimento.

5.3.2 Cetose sanguínea

A cetose foi mensurada pelo uso das fitas de química seca de cetose *Freestyle Optium Cetona*® e do aparelho digital *Freestyle Optium Neo*® (Abbott, SP), a partir do sangue coletado da cauda nos momentos T4 e T5 do experimento. A concentração de cetose está expressa em mmol/L.

5.4 Testes comportamentais

No período T3, os animais foram transportados para a Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) para realizar os testes comportamentais.

De maneira geral, é importante observar que os testes comportamentais com roedores costumam mensurar aspectos cognitivos como a memória de curto e longo prazo e aspectos comportamentais como a ansiedade, o medo, as atividades locomotora e exploratória. Entre as áreas cerebrais envolvidas nesses aspectos, temos regiões como o lobo frontal e o hipocampo.

5.4.1 Campo aberto

O teste de campo aberto foi utilizado para avaliar a atividade locomotora e exploratória do animal (WALSH, 1976). Foi realizado em uma arena circular (raio de 80

cm) cercada por paredes de 50 cm de altura, dividida com linhas pretas situadas no piso do campo, contendo 19 quadrantes. Cada animal foi colocado individualmente na arena, onde permaneceu por 10 minutos, durante os quais, seu comportamento foi gravado e, posteriormente, foram analisados os seguintes parâmetros: distância total percorrida durante/ o teste, medida por meio do número de cruzamentos que o animal fez nas linhas divisórias contidas no piso para avaliar a locomoção; distância percorrida nos diferentes compartimentos do campo aberto (centro e periferia) e tempo gasto em cada um desses compartimentos. Além disso, também foram contabilizados o número de levantadas nas patas traseiras (*roaring*), o número de autolimpezas (*grooming*) e o número de defecações de cada animal. Um cruzamento foi considerado somente quando o animal esteve em um quadrante com as quatro patas. Após cada animal concluir a tarefa foram coletadas eventuais fezes e a arena foi higienizada com papel e álcool 70% para evitar que o cheiro e resíduos de outros animais influenciassem no comportamento dos próximos animais.

5.4.2 Reconhecimento de objetos

Neste teste os animais foram colocados em uma arena (semelhante ao campo aberto), a fim de avaliar o quanto eles interagem com um novo objeto, testando-se, assim, a memória de longo prazo (MLP), muito ligada ao hipocampo, como parte do sistema límbico, ao hipotálamo e ao córtex pré-frontal. O teste foi realizado como descrito por ENNACEUR e DELACOUR (1988), com algumas modificações. No primeiro dia do teste, fez-se uma sessão de 10 minutos na qual os animais foram posicionados no centro do campo e deixados à vontade para explorar dois objetos de plástico idênticos (A e B), localizados a 10 cm de distância das paredes (fase de apresentação). Após o animal concluir a tarefa a arena foi limpa com álcool 70% para evitar que o cheiro e resíduos de outros animais influenciem no comportamento dos próximos. Durante as etapas do teste, os objetos foram fixados com uma fita adesiva no chão, para que os animais não os removessem do lugar onde estavam fixados.

Para avaliar a MLP, os animais foram testados nas mesmas condições, 24 horas após a fase inicial. As posições dos objetos no teste foram mantidas, porém um dos objetos anteriormente fixado, o objeto B foi substituído por um novo objeto, C, diferente daquele do primeiro dia.

Os animais foram colocados na arena sempre voltados para a mesma parede em todas as sessões (DE BRUIN et al., 2011). A exploração dos objetos foi contabilizada a

partir dos vídeos gravados durante as duas sessões e foi considerada somente quando o animal cheirou um ou outro objeto a uma distância menor que 2 cm ou tocou o objeto com o focinho. Sentar-se, apoiar-se ou andar ao redor dos objetos não foi considerado comportamento exploratório (MELLO-CARPES e IZQUERDO, 2013).

Os resultados foram expressos como o percentual de tempo de exploração de cada objeto. O índice de discriminação (ID) foi calculado como o tempo explorando o novo objeto considerando o tempo total por meio da equação apresentada na **Figura 8**.

$$ID = \left\{ \frac{\left[\text{Tempo explorando o objeto novo} - \text{tempo explorando o objeto familiar} \right]}{\left[\text{Tempo explorando o objeto novo} + \text{tempo explorando o objeto familiar} \right]} \right\} \times 100$$

Figura 8. Índice de Discriminação (ID).

5.4.3 Labirinto em cruz elevado

Para avaliar o comportamento do tipo-ansioso, foi utilizado o labirinto em cruz elevado (PELLOW et al., 1985), que consiste em um aparelho com dois braços abertos (aversivos ao animal) perpendiculares a dois braços fechados, de mesmo tamanho, e cercados por paredes de 40 cm de altura. Cada braço é dividido em três segmentos (16 por 12 cm), havendo um segmento central comum aos quatro braços. O labirinto fica elevado a 60 cm do chão. Cada animal foi colocado individualmente no compartimento central, voltado para um dos braços abertos. O comportamento dos animais foi filmado para posterior análise. Durante a sessão, com duração de 5 minutos, foram avaliados os seguintes parâmetros: número de entradas nos braços abertos e nos braços fechados; número total de entradas (braços abertos mais braços fechados); e o tempo nos braços abertos e fechados. A partir desses dados foi calculado o índice de ansiedade (IA) (**Figura 9**).

$$IA = 1 - \left\{ \frac{\left(\frac{\text{Tempo nos braços abertos}}{\text{Duração do teste}} \right) + \left(\frac{\text{Entradas nos braços abertos}}{\text{Número total de entradas}} \right)}{2} \right\} \times 100$$

Figura 9. Índice de Ansiedade (IA). Adaptado de COHEN et al., 2013.

Após cada animal concluir a tarefa a arena foi limpa com álcool 70% para evitar que o cheiro e resíduos de outros animais influenciassem no comportamento dos próximos.

5.4.4 Condicionamento de medo ao contexto

O teste de condicionamento de medo ao contexto de acordo com FERNANDES e colaboradores (2016), permite avaliar a aprendizagem e a memória por meio da tarefa de condicionamento de medo ao contexto em três dias consecutivos. No primeiro dia, os animais foram colocados em uma caixa de condicionamento formada por paredes de acrílico pretas e uma base de barras metálicas condutoras de corrente elétrica. Após 2 minutos de exploração, os animais receberam um estímulo sonoro por 30 segundos e, após esse evento, um choque de 0,8mA por 1 segundo. Os animais permaneceram ainda 30 segundos em observação, antes de serem devolvidos às suas caixas. No dia seguinte, os animais foram reexpostos à caixa de condicionamento por 4 minutos. Durante o teste, os animais não receberam nenhum estímulo aversivo. No terceiro dia, os animais foram inseridos em um novo ambiente (contexto), uma arena circular de paredes opacas com raio de 20 cm. Após 2 minutos, eles foram submetidos a dois sinais sonoros por 30 segundos, com um intervalo de 30 segundos entre eles, e outro, após o segundo sinal sonoro. O parâmetro de aprendizagem avaliado para a tarefa foi a ausência de movimento de vibrissas e do ato de farejar que foi registrada minuto a minuto, nos três dias de experimento.

5.5 Análises de PET/CT

No período T4, os animais foram transportados para o Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) para realizar os exames de varredura por tomografia por emissão de pósitrons (PET/CT) com FDG 18-F (fluorodeoxiglicose).

Importante ressaltar que os animais não foram submetidos a jejum prévio aos exames. Para possibilitar a manipulação, os animais foram anestesiados pela inalação de isoflurano a 3% veiculado em oxigênio 100% (fluxo de gás = 1 mL.min⁻¹). Em seguida, receberam 15-20 MBq de FDG 18-F (100-200µL de solução salina (0,9%) via punção da veia da cauda. Após 45 minutos da administração de FDG 18-F, eles foram posicionados em decúbito ventral no centro do campo de visão e realizou-se a aquisição de dados estáticos durante 15 minutos em um sistema de imagem Bruker Albira microPET/SPECT/CT® (Bruker Biospin Corporation, Woodbridge, CT, EUA). Essa aquisição das imagens ocorreu sob temperatura controlada (37°C) e foi seguida pela realização de tomografia computadorizada (CT) para aquisição de imagens durante 5 minutos (FOV 80 mm, 35 kV, 400µA). As varreduras de PET e CT foram reconstruídas com o software Albira® (Bruker Biospin Corporation, Woodbridge, CT, EUA) com Maximização de Expectativa de Subconjuntos Ordenados (OSEM) e Retroprojeção Filtrada (FBP) de algoritmos, respectivamente. Nenhuma correção para efeitos de volume parcial foi aplicada. As imagens foram processadas com o software PMOD® (PMOD Technologies, Zurich, CH). Os padrões cerebrais que definem as regiões 3D de interesse (*Region of Interest* - ROI) foram definidos e os valores médios de captação padronizados, definidos como a razão entre a concentração de atividade no tecido (kBq/mL) e a atividade injetada por peso do paciente (kBq/g), foram calculados para cada ROI. Todos os experimentos com animais foram realizados em conformidade com as leis relevantes e foram aprovados pelo Comitês de Ética Animal do Instituto de Pesquisas em Energia Nuclear - IPEN (CEUA 273/20) (**Anexo 3**).

5.6 Eutanásia e coleta dos órgãos

Após realizados os testes e os exames, no momento T5, os animais foram transportados para a Faculdade de Saúde Pública para a realização da eutanásia e coleta dos tecidos para análise.

Os animais foram decapitados em guilhotina por ser um método rápido e com mínimas alterações químicas que poderiam ser decorrentes de métodos que utilizam fármacos. Após a decapitação, o sangue foi coletado em tubos com EDTA e o encéfalo foi cuidadosamente removido da caixa craniana (**Figura 10**), pesado na Balança Analítica com precisão de 1mg e limite de capacidade de 220g Shimadzu, AUY220 (Shimadzu do Brasil, Barueri-SP) e medido com o uso de um paquímetro digital (6 Pol., DIGIMESS Cód. 100.174BL), registrando-se o maior comprimento do órgão do lobo central ao lobo occipital.



Figura 10. Retirada do encéfalo da caixa craniana e ressecção do encéfalo à metade.

O lobo frontal (LF) foi seccionado em duas metades (**Figura 11**). Uma metade foi conservada em formol à 10% e destinada à confecção de lâminas para histologia, como mostra o plano amostral para o LF (**Figura 12**). A outra metade, após pesada, foi congelada a -80°C . Foram então seccionados o hipotálamo (HP) e o hipocampo (HC), que, após pesados, assim como o restante do cérebro, foram congelados a -80°C .



Figura 11. Ressecção do lobo frontal.

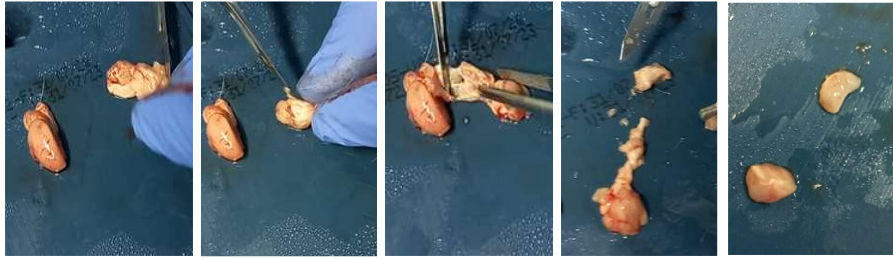


Figura 12. Ressecção do hipocampo.

Em um momento posterior, os segmentos do LF e HC foram descongelados e divididos em três partes de aproximadamente 20mg cada, de acordo com seus planos amostrais (**Figuras 13 e 14**). Cada fragmento (20mg) foi processado, segundo metodologia padrão, e destinado a uma etapa analítica posterior.

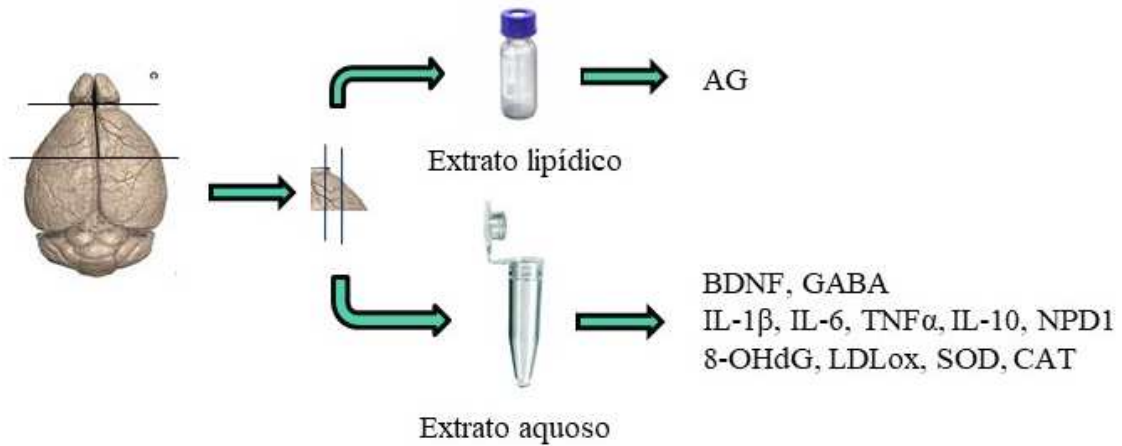


Figura 13. Fluxo do plano amostral para o Lobo Frontal.



Figura 14. Fluxo do plano amostral para o hipocampo.

5.7 Preparo dos extratos

5.7.1 Extrato aquoso

A partir de 20mg do LF e do HC foram feitos os extratos. A cada um dos tecidos foram adicionados 1 mL de RIPA Buffer (Sigma-Aldrich, R0278) e 10 μ L do coquetel de inibidores de fosfatase e protease (Sigma-Aldrich, PPC1010) para evitar decomposição da amostra. Depois, o tecido foi homogeneizado com um desmembrador sônico (Fisher Scientific, modelo 150E) por 20 segundos (dois ciclos de 10 s) até a completa dissolução do tecido. O extrato resultante foi aliquoteado em microtubos, com 2 alíquotas de 200 μ L e as demais alíquotas com 60 μ L para posterior análises.

5.7.2 Extrato lipídico

A partir de 20 mg do LF e do HC foi feito o preparo dos extratos lipídicos. Foram acrescentados a cada 20 mg de tecido, 3 mL de solução de KCl a 0,1M preparada com água Milli-Q. Em seguida, o tecido foi homogeneizado com um desmembrador sônico (Fisher Scientific, modelo 150E) por 20 segundos (dois ciclos de 10 s) até a completa dissolução do tecido. Após esse procedimento, foram acrescentados 2 mL de clorofórmio e 1 mL de metanol, seguido de agitação em vórtex por 30 segundos e centrifugação a 3000 rpm, por 15 minutos, a 4°C (Hitachi® – Himac CR 21GII). Após a centrifugação, o sobrenadante foi pipetado e desprezado, enquanto a fase inferior foi destinada ao processo de esterificação dos ácidos graxos extraídos.

5.8 Análise de ácidos graxos dos tecidos cerebrais

Os lipídios foram esterificados a partir dos extratos mencionados no item 5.7.2, utilizando-se 1,75 mL de metanol, 100 μ L de cloreto de acetila e 50 μ L de padrão interno, contendo 1 mg/mL de ácido tridecílico (C13) em hexano. Os tubos vedados foram aquecidos a 100 °C por 60 minutos. Após esta etapa, adicionamos 1,5 mL de hexano e os tubos foram agitados em vórtex durante 1 minuto. As amostras foram então centrifugadas a 1500 rpm por 2 minutos e a 4 °C (Hitachi® Himac CR, Modelo 21GII), e a fase orgânica (sobrenadante) foi coletada em tubos Falcon de 15 mL. Este procedimento de extração foi repetido com 0,75 mL hexano para otimizar a extração

lipídica. A solução combinada de hexano foi evaporada no concentrador evaporador “Centrivap” resistente a ácidos (Lanconco, Modelo 7810016) por 20 minutos a 40° até à total evaporação dos solventes orgânicos. O resíduo seco foi ressuspenso com 300 µL de hexano e imersão em banho ultrassônico (Elma, D 78224) por 5 minutos. Após esta etapa, a solução foi filtrada utilizando filtros PVDV 0,22µm (Analítica, Cód. 2202225100CW) e armazenada dentro de *vials* de 1,5 mL (Analítica, Cód. 1T10209300) para análise posterior.

O perfil de ácidos graxos foi determinado em um cromatógrafo a gás (Shimadzu, CG-2010), equipado com uma coluna capilar DB-FFAP (15m x 0,100mm x 0,10µm 0 J e W Scientific, Agilent Technologies). O hidrogênio foi utilizado como gás de arraste com fluxo de 0,27 mL/min, com vazão de 35 cm/s e pressão de 187,8 kPa. As taxas de fluxo de ar sintético, N₂ e H₂ foram, respectivamente, 300, 30 e 30 mL/min. As temperaturas do injetor e do detector foram de 250°C e 260°C, respectivamente. A programação de temperaturas da coluna foi de 100°C inicial, com retenção de 0,5 min, rampa de 25°C/min até 195°C, 3°C/min até 205°C, 8°C/min até 230°C, com retenção de 4 min, 50°C/min até 245°C, retendo por 0,5 min. A razão Split utilizada no injetor foi de 1:100 e o tempo de corrida total foi de 15,56 min. O volume de injeção foi de 2µL, em injetor automático (AOC 20i, © Shimadzu, 2000-2011). Os ácidos graxos foram identificados por meio da comparação dos tempos de retenção do padrão externo FAME (Supelco 37 Component FAME Mix; Sigma-Aldrich, CRM47885) com as amostras. O percentual de cada ácido graxo foi calculado em relação à área total dos ácidos graxos analisados a partir do cromatograma, utilizando-se a metodologia “*valley to valley*” (**Figura 15**), na qual os picos são integrados estabelecendo-se o ponto de início e final do vale entre os picos, como sendo a linha de base. A integração foi realizada no software GC Solutions Versão 2.41.00 SU1, © Shimadzu, 2000-2011.

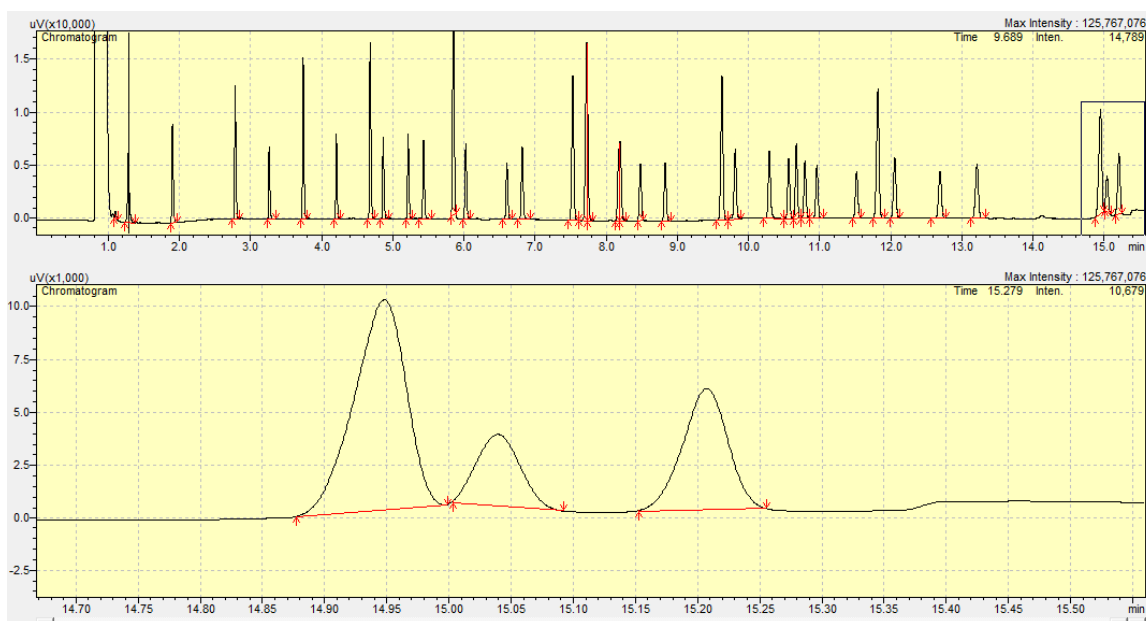


Figura 15. Integração de picos pela metodologia *valley to valley*. No detalhe, as áreas dos ácidos graxos Lignocérico, Docosaehaenóico (DHA) e Nervônico do padrão externo FAME.

5.9 Análise de proteínas

Ao quantificarmos os parâmetros bioquímicos, inflamatórios e oxidativos com métodos que se referem às quantidades de moléculas de natureza proteica é necessário fazermos uma relação com a quantidade total de proteínas no tecido em estudo. Portanto, a partir dos extratos aquosos, as proteínas totais do HC e do LF foram quantificadas com o uso do kit *Pierce BCA Protein Assay Kit* (Thermo Fisher, Cód. 23225). A leitura da absorbância foi feita em placas com 10 μ L de amostra e 200 μ L dos reagentes A e B em 562nm, após 30 minutos de incubação a 37°C. As análises foram feitas em triplicata das amostras com um coeficiente de variação < 15%. Os valores finais foram obtidos em relação à curva padrão com a albumina.

5.10 Parâmetros bioquímicos

Foram analisados o BHB, o BDNF e o GABA.

5.10.1 Análise do β -hidroxibutirato (BHB)

A concentração de BHB foi determinada no plasma dos animais com o uso do kit Ranbut (Randox, Cód. RB1007). Optou-se por utilizar o método para análise manual em cubeta como descrito no protocolo do kit. Foram feitas três leituras das absorbâncias a 340nm com intervalo de 60 segundos entre elas. O cálculo da concentração de BHB foi feito a partir da fórmula descrita na **Figura 16** que considera a relação entre a diferença das absorbâncias das amostras pela diferença das absorbâncias do padrão multiplicando-se o resultado dessa razão pela concentração do padrão de BHB (1,03 mmol/L). O resultado foi expresso em mmol/L. A concentração mínima detectável de BHB comum nível aceitável de precisão foi de 0,100 mmol/L.

$$[\text{BHB mmol/L}] = \left\{ \frac{\Delta\text{Amostra}}{\Delta\text{Padrão}} \times [\text{Padrão}] \right\}$$

Figura 16. Equação para cálculo da concentração de β -hidroxibutirato (BHB).

5.10.2 Análise de Fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF)

O BDNF foi quantificado nos extratos aquosos de LF e HC, utilizando-se o kit BDNF DuoSet® ELISA (R&D Systems, Cód. DY248) baseado em um ELISA sanduíche. A placa foi sensibilizada e mantida *overnight* em temperatura ambiente. No dia seguinte, foram pipetados 50 μ L de amostra, sendo os demais procedimentos seguidos conforme orientações do kit. A densidade óptica foi lida usando-se um leitor de microplacas ajustado para 450nm. As análises foram feitas em duplicata e o coeficiente de variação aceito foi < 15%. Os valores foram calculados com base na curva linear padrão. O fabricante do kit considera como faixa de detecção os valores entre 23,4 a 1.500 pg/mL. Após a obtenção dos valores preliminares, os valores finais foram obtidos normalizando-se pela concentração de proteínas totais.

5.101.3 Análise de Ácido γ -aminobutírico (GABA)

A concentração do GABA foi determinada nos extratos aquosos de LF e HC, por meio do kit *GABA Rat Gamma-Aminobutyric Acid ELISA Kit* (MyBiosource, Cód. MYBI-MBS269152). O kit é baseado na técnica de ELISA sanduíche. Foram pipetados 100 μ L das amostras e do padrão e, após as etapas de lavagem e incubação, obtivemos os resultados de absorbâncias pela leitura a 450nm. A concentração foi calculada pela aplicação da fórmula fornecida pela curva polinomial, plotada a partir dos valores do padrão. O fabricante do kit considera como faixa de detecção os valores entre 31,2 a 2.000 pg/mL. Os valores finais foram normalizados pela concentração de proteínas e expressos em pg/mg de proteínas.

5.11 Parâmetros inflamatórios

5.11.1 Análise de Citocinas

A concentração de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, TNF- α) e anti-inflamatória Interleucina 10 (IL-10) foi avaliada utilizando-se o kit *MILLIPLEX® Rat Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel - Immunology Multiplex Assay* da Merck EMD Milipore, Cód. RECYTMAG-65K-04, a partir do extrato aquoso do HC e do LF. As análises foram realizadas na Rede Premium (FMUSP), sob a responsabilidade da Biologista do Laboratório de Análises Especiais, Caroline Silvério Faria.

O método é semelhante ao ELISA sanduíche, porém, utiliza microesferas coloridas fluorescentes (*beads*) que se ligam, de forma covalente, aos anticorpos de captura. Elas foram pipetadas em uma placa com 96 poços. A seguir, foram pipetadas as amostras, controles e curva padrão, branco e incubadas em agitador de placas (IKA MTS 2/4 digital), de acordo com as instruções das bulas dos kits utilizados. Após lavagens, o anticorpo de detecção foi adicionado à placa, que passou por novo período de incubação. As lavagens foram realizadas em uma lavadora magnética (*Bio-plex PRO II Wash Station*) e as microesferas permanecem retidas na placa pela ação de um ímã. Foi adicionada, posteriormente, a estreptavidina-ficoeritrina, que emitiu sinal fluorescente quando excitada por diodo emissor de luz (LED do inglês *light emitting diode*) do equipamento de leitura, e incubada por um breve período. Após a lavagem para remoção dos reagentes não aderidos, foi adicionada aos poços uma solução tampão para serem

analisados no equipamento leitor de microesferas *Magpix Milliplex* (Luminex Corp, Austin, Texas, USA), no qual dois LEDS, um verde com comprimento de ondas de 525nm identifica os biomarcadores, e um vermelho (635nm) identifica a microesfera, e uma câmera com dispositivo de carga acoplado (CCD, do inglês *charge-coupled device*) captura essas imagens e envia para o software *Xponent 4.2* (Luminex Corp, Austin, Texas, USA). Posteriormente, fez-se a análise dos dados utilizando-se o software *Milliplex Analyst 5.1* (EMD Millipore).

As concentrações das citocinas foram determinadas com base no ajuste da curva padrão para a intensidade média de fluorescência (MFI, do inglês *media fluorescence intensity*) e os resultados foram expressos em pg/mL, seguido do ajuste pela concentração de proteínas totais (pg/mg de proteínas).

5.11.2 Análise de Neuroprotectina D (NPD)

A neuroprotectina D (NPD) também foi quantificada no LF e no HC, a partir do extrato aquoso, mediante utilização do kit *Rat Neuroprotectin D1 (NPD1) ELISA* (MyBiosource, Cód. MBS9393332). Após o teste de validação, definiu-se que não seria necessário diluir as amostras. Assim, 50µL das amostras e do padrão foram pipetadas e, após as etapas do protocolo, a placa foi lida a 450nm. Os resultados foram calculados após subtração dos brancos dos valores obtidos de absorvância das amostras e do padrão e aplicação da fórmula fornecida pela curva polinomial. A sensibilidade de detecção informada pelo fabricante do kit é de 0,1 ng/mL, com uma faixa detectável de 0,625 a 20 ng/mL. Os valores finais foram normalizados pelos valores de proteínas totais e expressos em ng/mg de proteínas.

5.12 Parâmetros Oxidativos

5.12.1 Análise de 8-Hidroxi-desoxiguanosina (8-OHdG)

O produto de oxidação da guanosina, que avalia o dano oxidativo ao RNA e ao DNA, foi quantificado por meio da detecção da 8-OHdG com a utilização do kit 8-OHdG ELISA Kit (Colorimetric, Novus Biologicals, Cód. NOVU-NBP300370). O princípio do método é o ELISA competitivo. A partir dos extratos aquosos de LF e HC, a concentração foi determinada por comparação dos valores de absorvância obtidos com leitura à 450 nm

com os valores da curva padrão. Para o cálculo dos resultados foi preciso plotar uma curva logística de quatro parâmetros com a concentração padrão no eixo x e os valores de OD no eixo y. O gráfico foi plotado no programa Excel, após instalação do *Add-in MyCurveFit*, obtido do site: <https://www.myassays.com/download-and-install-mycurvefit-excel-add-in.html>. A sensibilidade do ensaio é determinada em 0,94 ng/mL. A concentração de 8-OHdG foi normalizada pela concentração de proteínas e apresentada na unidade de ng/mg de proteínas.

5.12.2 Análise de lipoproteína de baixa densidade oxidada (LDLox)

A concentração de LDLox foi determinada utilizando-se o *kit Rat Oxidized LDL ELISA* (Colorimetric, Novus Biologicals, Cód. NBP2-79692). A análise foi feita com 100µL das amostras dos extratos aquosos de LF e HC, após testada a resposta em diferentes concentrações. A leitura a 450nm, após as etapas de adição das soluções de detecção, do conjugado, do substrato até a solução de parada, e pelas lavagens indicadas no protocolo, forneceu os resultados que foram calculados a partir da aplicação do padrão na equação fornecida pela curva polinomial às absorbâncias obtidas. O fabricante admite precisão em torno de $1,5 \pm 0,10$ a $13,0 \pm 0,40$ ng/mL dos valores obtidos. Em seguida, procedeu-se a normalização dos valores obtidos pelas proteínas e sua apresentação em ng/mg de proteína.

5.12.3 Análise de superóxido dismutase (SOD)

O kit SOD (Sigma-Aldrich, Cód. 19160) permite uma análise da atividade da enzima antioxidante Superóxido Dismutase (SOD), utilizando-se o sal de tetrazólio altamente solúvel em água, WST-1 [sal monossódico 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2Htetrazólio] que produz um corante formazan solúvel em água após sofrer redução ao reagir com o ânion superóxido. A taxa de redução do O₂ está linearmente relacionada com a atividade da xantina oxidase (XO), e é inibida pela SOD, conforme mostrado na **Figura 17**.

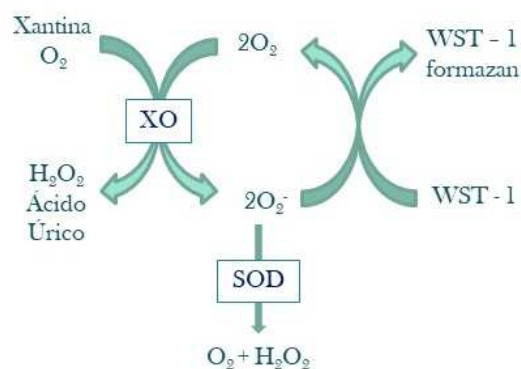


Figura 17. Inibição da Xantina Oxidase (XO) pela Superóxido Dismutase (SOD).

Como a absorbância em 440 nm é proporcional à quantidade de ânion superóxido, a atividade da SOD, como a atividade de inibição da enzima responsável pela produção desse íon pode ser quantificada medindo-se a diminuição de sua detecção. A análise foi feita em duplicata com coeficiente de variação < 15%. O resultado preliminar foi expresso em percentual de atividade da SOD, calculado de acordo com a orientação do fabricante do kit (**Figura 18**). Após obtidos, os valores foram normalizados pelas proteínas e expressos em U/mg.

$$ASOD = \left\{ \frac{(\text{Branco 1} - \text{Branco 3}) - (\text{Amostra} - \text{Branco 2})}{(\text{Branco 1} - \text{Branco 3})} \right\} \times 100$$

Figura 18. Fórmula para calcular a atividade da Superóxido Dismutase (SOD) a partir dos valores de absorbância dos 3 brancos e da amostra.

5.12.3 Análise da catalase (CAT)

Para avaliar a atividade da enzima antioxidante catalase (CAT) foi utilizado o *Catalase assay kit* (Cayman Chemical, Cód. CAYM-707002). O método é baseado na reação da enzima com o metanol na presença de concentrações otimizadas de H_2O_2 . O formaldeído produzido é medido em uma reação colorimétrica a 540 nm, tendo como cromógeno o 4-amino-3-hidrazino-5-mercapto-1,2,4-triaol (Purpal). Após a subtração do padrão A de todos os padrões, plotou-se a curva padrão. A concentração de formaldeído foi então calculada a partir da aplicação da fórmula apresentada na **Figura 19**.

$$\text{Formaldeído } (\mu\text{M}) = \left\{ \frac{\text{Absorbância da amostra} - (\text{y-intercepto})}{\text{declinação}} \right\} \times \frac{0,17\text{ml}}{0,02\text{ml}}$$

Figura 19. Fórmula para cálculo da concentração de formaldeído.

Em seguida, calculamos a atividade da catalase, com base na equação apresentada na **Figura 20**. Os fabricantes do kit informam que uma atividade da CAT entre 2 e 35 nmol/min/mL pode ser considerada sem que seja necessária nenhuma diluição ou concentração da amostra. Após observarmos a adequação dos nossos resultados à essa faixa de valores, normalizamos os resultados pela concentração de proteínas, expressando-os em nmol/min/mg.

$$\text{Atividade da CAT} = \left\{ \frac{\mu\text{M de formaldeído de cada amostra}}{20 \text{ min}} \times \text{Diluição da amostra} \right\} = \text{nmol/min/ml}$$

Figura 20. Fórmula para cálculo da atividade da catalase (CAT).

5.13 Análise Estatística

Todos os resultados estão expressos sob a forma de média, desvio padrão ou erro padrão da média e apresentados em figuras e tabelas. Os testes estatísticos foram realizados nos programas *Statistical Package for the Social Sciences*® (SPSS) versão 20.0 e JASP 0.14.1.0. Considerando que dois animais foram a óbito ao longo do experimento, um deles morreu no transporte entre a UNIFESP e o IPEN e o outro após a injeção da solução salina com FDG-18, e que havia vários dados coletados destes animais, decidimos utilizar a ferramenta *Expectation Maximization* (EM), disponível no SPSS, cujo algoritmo inicialmente estima os valores faltantes e, em seguida, os maximiza levando em consideração as demais variáveis do indivíduo, do grupo e entre os grupos, para que tivéssemos uma base mais completa.

Após a estimação dos valores faltantes, a definição dos testes utilizados para se buscar diferenças significativas foi condicionada ao tipo de distribuição das variáveis. Considerando-se os três grupos, para as variáveis com distribuição normal, segundo o

teste de *Shapiro-Wilk* e com igualdade de variâncias, verificada pelo teste de *Levene*, foi utilizado o teste paramétrico *ANOVA* com post-hoc de *Bonferroni*. Para as variáveis que ficassem com valores de $p < 0,05$ no teste de normalidade e/ou no teste de igualdade de variâncias, utilizou-se o teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis*, seguido pelo *post-hoc de Dunn*. De maneira geral, para todos os testes estatísticos foi adotado o nível de significância de $p < 0,05$. É importante citar que, para algumas variáveis a estimativa dos valores faltantes resultou em valores outliers. Nesses casos, mantivemos o n original, excluindo os valores estimados.

6. RESULTADOS

6.1 Monitoramento dos animais

6.1.1 Consumo de ração, calorias e água

Os grupos DCC e DCM consumiram menos ração que o grupo DP nos tempos T2 ($p < 0,001$ e $p = 0,005$, respectivamente), T3 ($p = 0,007$ e $p < 0,001$, respectivamente) e T4 ($p = 0,004$ e $p < 0,001$, respectivamente). No momento T1, houve consumo menor apenas no grupo DCM em relação ao grupo DP ($p = 0,011$). No momento T5 não houve diferença no consumo de ração (**Figura 21 - A**).

O consumo de calorias (**Figura 21 - B**) apresentou diferenças no T1 sendo superior nos grupos DCC e DCM ao consumo do grupo DP ($p < 0,001$ para ambos). Manteve essa diferença em T2 ($p = 0,019$ e $p < 0,001$, respectivamente). Seguindo essa tendência, em T3, a ingestão calórica foi maior nos grupos DCC ($p = 0,006$) e DCM ($p = 0,041$) em relação ao grupo DP. O mesmo em T4 com ingestão calórica maior nos grupos DCC ($p = 0,032$) e DCM ($p = 0,008$) em relação ao grupo DP. Em T5 não houve diferença.

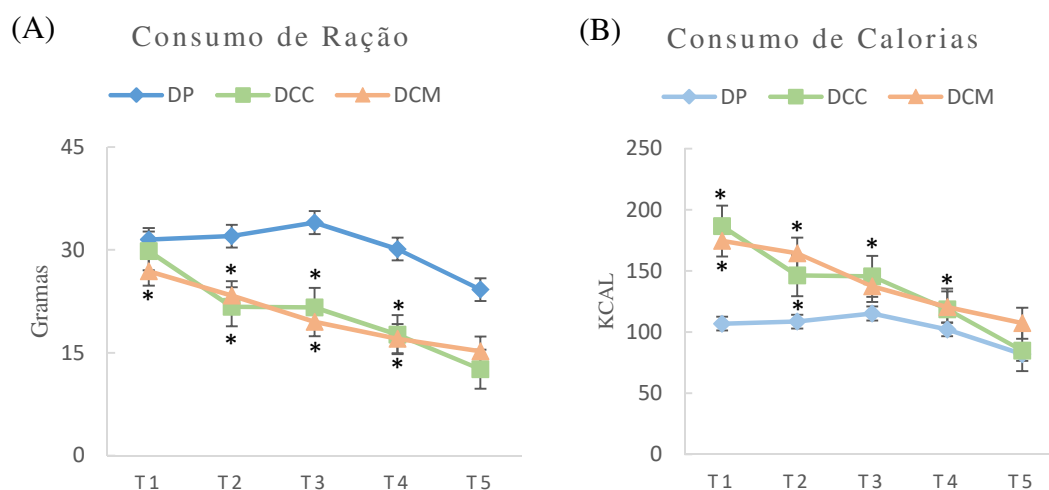


Figura 21. Consumo de (A) ração e de (B) calorias dos grupos DP, DCC e DCM ao longo do período experimental. *Diferença em relação ao grupo DP. Resultados apresentados em média (erro padrão da média). N = 6. Para dados com distribuição normal e homogeneidade de variâncias, teste ANOVA com post hoc de Bonferroni. Para dados não paramétricos, teste de Kruskal-Wallis com post hoc de Dunn. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

Observando-se o consumo médio de rações e calorias (**Figura 22**) ao longo do período, viu-se que, mesmo com um menor consumo de ração, houve um maior consumo calórico nos grupos DCC ($p=0,005$ e $p=0,005$) e DCM ($p<0,001$ e $p=0,005$) em relação ao grupo DP.

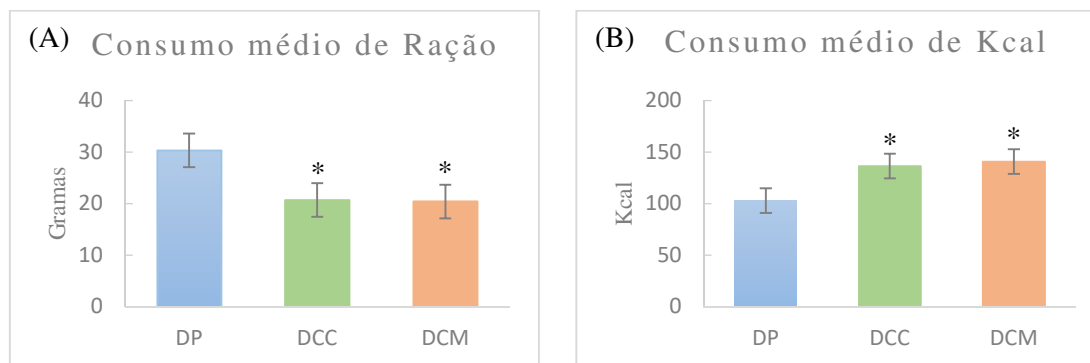


Figura 22. Consumo médio de (A) ração e de (B) calorias. *Diferença em relação ao grupo DP. Resultados apresentados em média (erro padrão da média). N = 6. Para dados com distribuição normal e homogeneidade de variâncias, teste ANOVA com post hoc de Bonferroni. Para dados não paramétricos, teste de Kruskal-Wallis com post hoc de Dunn. O nível de significância adotado foi de $p<0,05$.

Ao se observar o efeito da intervenção, considerando a diferença de consumo de calorias entre T5 e T1, também se verificou um menor consumo nos grupos DCC ($p<0,001$) e DCM ($p=0,004$) em relação ao grupo DP. No caso da ração, observou-se menor consumo dos grupos DP ($p=0,002$) e DCM ($p=0,008$) em relação ao grupo DCC.

O consumo de água (**Figura 23**) que foi semelhante entre os grupos em T1 e T5, apresentou-se menor para grupos DCC e DCM em relação ao grupo DP em T2 ($p=0,005$ e $p<0,001$, respectivamente), T3 ($p=0,015$ e $p=0,008$, respectivamente), e T4 ($p=0,002$ e $p=0,001$, respectivamente).

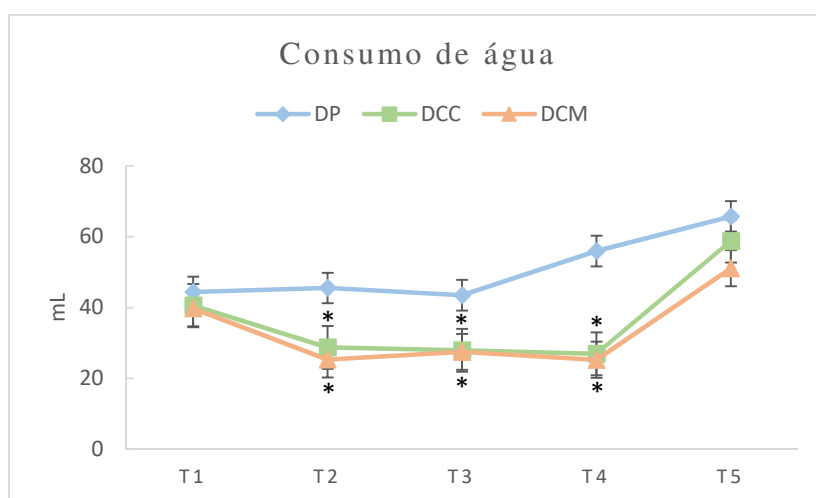


Figura 23. Consumo de água nos cinco tempos estudados. *Diferença em relação ao grupo DP. Resultados apresentados em média (erro padrão da média). N = 6. Para dados

com distribuição normal e homogeneidade de variâncias, teste ANOVA com post hoc de Bonferroni. Para dados não paramétricos, teste de Kruskal-Wallis com post hoc de Dunn. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

Ao se observar o consumo médio de água (**Figura 24**), conseguiu-se perceber que, de fato, houve um menor consumo pelos grupos DCC ($p=0,008$) e DCM ($p < 0,001$) em relação ao grupo DP.

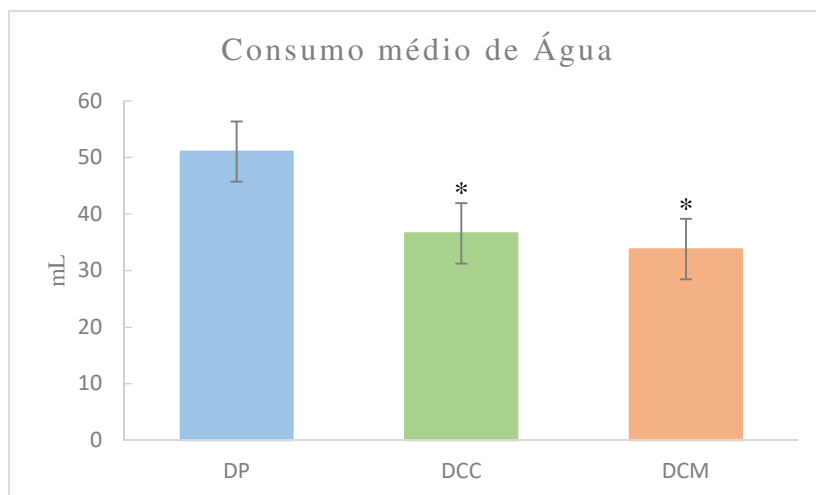


Figura 24. Consumo médio de água. *Diferença em relação ao grupo DP. Resultados apresentados em média (erro padrão da média). $N = 6$. Para dados com distribuição normal e homogeneidade de variâncias, teste ANOVA com post hoc de Bonferroni. Para dados não paramétricos, teste de Kruskal-Wallis com post hoc de Dunn. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

A variação do consumo de água entre os tempos T5 e T1 não diferiu entre os grupos.

6.1.2 Peso e comprimento dos animais

Não houve diferença no ganho de peso e no crescimento dos animais quando comparamos o efeito tempo entre os grupos experimentais (**Figura 25**). Quando avaliamos o efeito do tratamento, observamos que tampouco houve diferença.

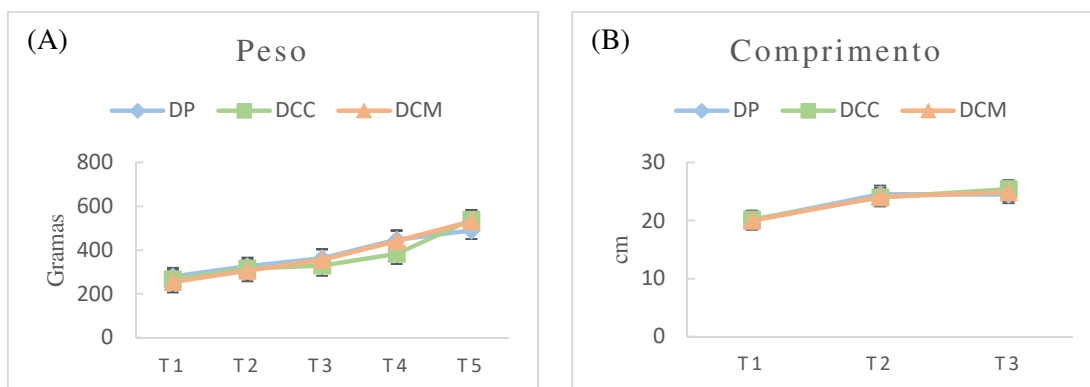


Figura 25. Peso (A) e comprimento (B) aferidos ao longo do experimento. Resultados apresentados em média (erro padrão da média). N = 6. Para dados com distribuição normal e homogeneidade de variâncias, teste ANOVA com post hoc de Bonferroni. Para dados não paramétricos, teste de Kruskal-Wallis com post hoc de Dunn. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

6.1.3 Coeficiente de Eficácia Alimentar (CEA) e Coeficiente de Ganho de Peso por Caloria Consumida (CGPCC)

Houve diferença para o CEA (**Tabela 5**) nos grupos DCC (0,002) e DCM ($p < 0,001$) em relação ao grupo DP ($p < 0,001$). Entretanto, os grupos apresentaram perfis semelhantes quando avaliamos as CGPCC (**Tabela 5**).

Tabela 5. Coeficiente de Eficácia Alimentar (CEA) e Coeficiente de Ganho de Peso por Caloria Consumida (CGPCC) dos animais submetidos a tratamento com DP, DCC e DCM durante 100 dias de intervenção.

Variáveis	DP	DCC	DCM	P
CEA	0,08 (0,02)	0,15 (0,03)*	0,16 (0,03)*	<0,001
CGPCC	0,02 (0,01)	0,02 (0,01)	0,02 (0,01)	0,821

*Diferença em relação ao grupo DP. Resultados apresentados em média (desvio padrão). N = 6. Para dados com distribuição normal e homogeneidade de variâncias, teste ANOVA com post hoc de Bonferroni. Para dados não paramétricos, teste de Kruskal-Wallis com post hoc de Dunn. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

6.1.4 Cetose sanguínea

A eficácia das DC (**Tabela 6**) foi evidenciada pela cetose detectada no sague da cauda dos animais nos momentos T4 e T5 ($p < 0,001$ para os grupos DCC e DCM em relação ao grupo DP).

Tabela 6. Cetose medida a partir do sangue da cauda dos animais submetidos a tratamento com DP, DCC e DCM durante 100 dias de intervenção.

Variáveis	DP	DCC	DCM	P
Cetose T4	0,74 (0,29)	1,75 (0,23)*	2,17 (0,36)*	<0,001
Cetose T5	0,51 (0,16)	1,00 (0,17)*	1,05 (0,19)*	<0,001

*Diferença em relação ao grupo DP. Resultados apresentados em média (desvio padrão). N = 6. Para dados com distribuição normal e homogeneidade de variâncias, teste ANOVA com post hoc de Bonferroni. Para dados não paramétricos, teste de Kruskal-Wallis com post hoc de Dunn. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

Além da cetose aferida a partir do sangue da cauda dos animais, analisamos também o teor de BHB no plasma. Conforme esperado, observamos diferença entre os animais que consumiram as DCC ($p=0,004$) e DCM ($p=0,020$), quando comparadas ao grupo DP.

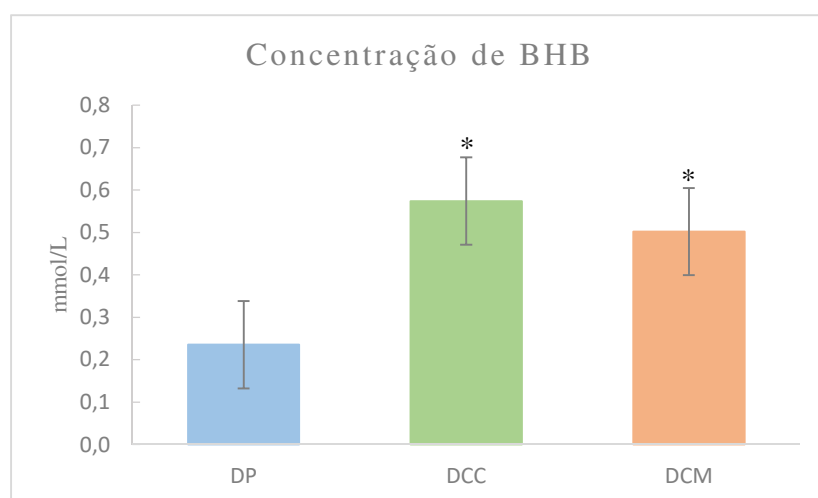


Figura 26. Concentração de BHB no plasma nos animais. *Diferença em relação ao grupo DP. Resultados apresentados em média (erro padrão da média). N = 5. Para dados com distribuição normal e homogeneidade de variâncias, teste ANOVA com post hoc de Bonferroni. Para dados não paramétricos, teste de Kruskal-Wallis com post hoc de Dunn. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

6.2 Peso e comprimento dos órgãos

Não houve diferença em relação ao peso absoluto, peso relativo e o comprimento do encéfalo (**Tabela 7**).

Tabela 7. Peso absoluto, peso relativo e comprimento do encéfalo dos animais submetidos a tratamento com DP, DCC e DCM durante 100 dias de intervenção.

Variáveis	DP	DCC	DCM	P
Peso absoluto do encéfalo (g)	2,05 (0,14)	2,06 (0,05)	2,24 (0,28)	0,449
Peso relativo do encéfalo (%)	0,42 (0,04)	0,39 (0,05)	0,37 (0,09)	0,468
Comprimento do encéfalo (mm)	21,48 (1,48)	22,26 (0,99)	21,10 (4,68)	0,783

Resultados apresentados em média (desvio padrão). N = 6. Para dados com distribuição normal e homogeneidade de variâncias, teste ANOVA com post hoc de Bonferroni. Para dados não paramétricos, teste de Kruskal-Wallis com post hoc de Dunn. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

6.3 Testes Comportamentais

6.3.1 Campo Aberto (CA)

No teste comportamental do CA, encontramos diferença apenas para o parâmetro número de defecações no grupo DCM ($p=0,042$), cujo perfil foi inferior ao grupo DP. Os demais parâmetros não apresentaram diferença estatística (**Tabela 8**).

Tabela 8. Resultados para o teste comportamental de Campo Aberto dos animais submetidos a tratamento com DP, DCC e DCM durante 100 dias de intervenção.

Variáveis	DP	DCC	DCM	P
Número de mudanças de quadrantes periféricos	91,9 (35,47)	101,7 (15,84)	88,7 (31,52)	0,724
Tempo nos quadrantes periféricos (segundos)	592,4 (7,94)	591,4 (7,61)	658,2 (101,16)	0,572
Número de entradas de quadrante central	2,9 (2,27)	3,7 (1,89)	3,4 (0,92)	0,763
Tempo no quadrante central (segundos)	7,6 (7,94)	8,6 (7,61)	8,2 (2,58)	0,715
Número de empinadas	42,3 (17,16)	41,0 (9,12)	40,6 (22,95)	0,984
Número de autolimpezas	4,7 (2,16)	6,4 (1,98)	5,6 (2,85)	0,458
Número de defecações	4,2 (2,36)	2,6 (1,20)	1,5 (1,34)*	0,043

*Diferença em relação ao grupo DP. Resultados apresentados em média (desvio padrão). N = 6. Para dados com distribuição normal e homogeneidade de variâncias, teste ANOVA com post hoc de Bonferroni. Para dados não paramétricos, teste de Kruskal-Wallis com post hoc de Dunn. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

6.3.2 Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

No teste do LCE foram evidenciadas diferenças em três parâmetros. No primeiro, evidenciou-se que os animais do grupo DCC ($p=0,025$) entraram menos vezes nos braços

abertos que os animais do grupo DP (**Figura 27 -A**). O grupo DCC ($p=0,001$) teve tempo nos braços fechados superior ao tempo do grupo DP (**Figura 27 - B**).

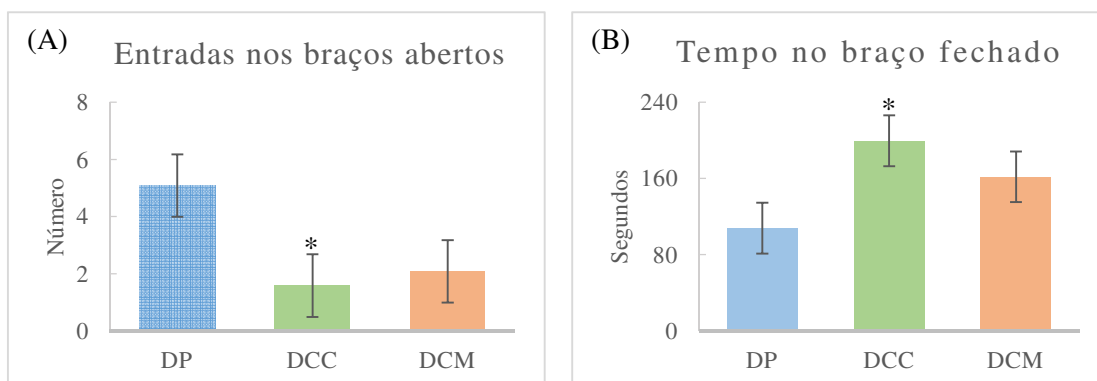


Figura 27. Número de entradas nos braços abertos (A) e tempo de permanência nos braços fechados (B) do teste do Labirinto em Cruz Elevado. * Diferença em relação ao grupo DP. Resultados apresentados em média (erro padrão da média). $N = 6$. Para dados com distribuição normal e homogeneidade de variâncias, teste ANOVA com post hoc de Bonferroni. Para dados não paramétricos, teste de Kruskal-Wallis com post hoc de Dunn. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

Esses parâmetros reforçaram as diferenças observadas no Índice de Ansiedade, no qual o grupo DCC apresentou valor superior ao grupo DP ($p=0,047$, **Figura 28**).

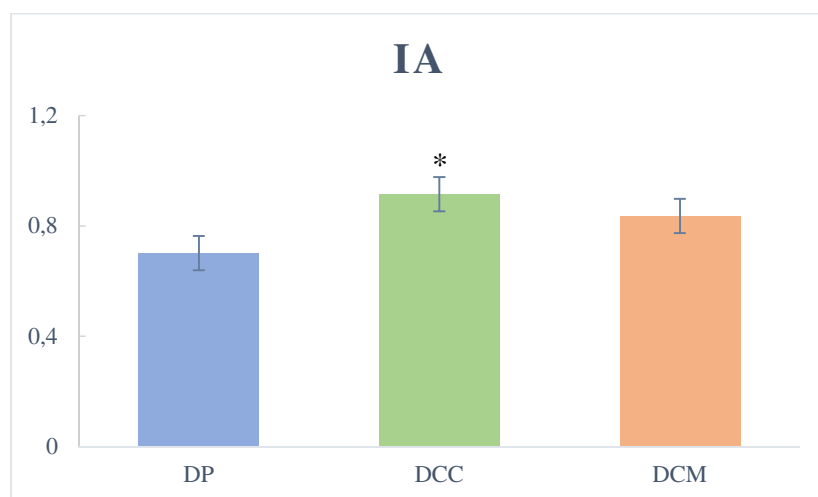


Figura 28. Índice de ansiedade (IA). * Diferença em relação ao grupo DP. Resultados apresentados em média (erro padrão da média). $N = 6$. Para dados com distribuição normal e homogeneidade de variâncias, teste ANOVA com post hoc de Bonferroni. Para dados não paramétricos, teste de Kruskal-Wallis com post hoc de Dunn. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

Ainda em relação ao teste de LCE, não houve diferença entre os grupos DCC e DCM para nenhum dos parâmetros estudados. Os demais parâmetros não apresentaram diferença estatística entre os grupos (**Tabela 9**).

Tabela 9. Resultados para o teste comportamental Labirinto em Cruz Elevado dos animais submetidos a tratamento com DP, DCC e DCM durante 100 dias de intervenção.

Variáveis	DP	DCC	DCM	P
Número de entradas nos braços abertos	5,1 (2,52)	1,6 (1,46)*	2,1 (1,88)	0,017
Tempo nos braços abertos (segundos)	76,5 (54,50)	12,5 (19,89)	40,9 (39,11)	0,069
Número de entradas nos braços fechados	9,8 (2,84)	9,6 (2,76)	8,3 (2,09)	0,572
Tempo nos braços fechados (segundos)	102,0 (27,63)	199,6 (32,98)*	157,1 (49,00)	0,002
Tempo no centro (segundos)	95,25 (30,56)	63,92 (11,23)	75,75 (20,34)	0,077
Número de espiadelas (avaliação de risco)	10,9 (4,47)	10,3 (3,34)	8,9 (2,78)	0,622
Tempo de espiadelas (segundos)	48,9 (18,98)	43,8 (11,79)	48,5 (21,92)	0,865
Índice de Ansiedade (IA)	0,70 (0,17)	0,91 (0,09)*	0,84 (0,13)	0,046

*Diferença em relação ao grupo DP. Resultados apresentados em média (desvio padrão). N = 6. Para dados com distribuição normal e homogeneidade de variâncias, teste ANOVA com post hoc de Bonferroni. Para dados não paramétricos, teste de Kruskal-Wallis com post hoc de Dunn. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

6.3.3 Reconhecimento de Objetos (RO)

No teste de RO, não houve diferença entre os grupos para nenhum dos parâmetros avaliados no primeiro dia (**Tabela 10**).

Tabela 10. Resultados para o primeiro dia do teste de Reconhecimento de Objetos dos animais submetidos a tratamento com DP, DCC e DCM durante 100 dias de intervenção.

Variáveis	DP	DCC	DCM	P
Número de interações com o objeto A	14,3 (6,74)	17,0 (3,73)	18,1 (5,09)	0,474
Tempo de interações com o objeto A (segundos)	22,8 (12,19)	32,9 (7,38)	37,8 (12,57)	0,085
Número de interações com o objeto B	13,4 (4,68)	15,8 (3,14)	15,6 (5,59)	0,614
Tempo de interações com o objeto B (segundos)	30,5 (13,68)	28,5 (11,71)	35,6 (13,30)	0,413

Resultados apresentados em média (desvio padrão). N = 6. Para dados com distribuição normal e homogeneidade de variâncias, teste ANOVA com post hoc de Bonferroni. Para

dados não paramétricos, teste de Kruskal-Wallis com post hoc de Dunn. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

No segundo dia do teste, não houve diferença entre os grupos para nenhum dos parâmetros. Esse perfil impactou na geração de um índice de discriminação negativo, uma vez que houve menor interesse dos animais em interagir com o objeto C (**Tabela 11**).

Tabela 11. Resultados para o segundo dia do teste de Reconhecimento de Objetos dos animais submetidos a tratamento com DP, DCC e DCM durante 100 dias de intervenção.

Variáveis	DP	DCC	DCM	P
Número de interações com o objeto A	17,8 (4,68)	17,7 (5,35)	23,0 (3,54)	0,109
Tempo de interações com o objeto A	27,7 (7,57)	28,2 (7,49)	32,7 (9,15)	0,522
Número de interações o objeto C	11,0 (4,86)	12,3 (5,00)	12,7 (2,88)	0,771
Tempo de interações o objeto C	20,0 (9,85)	18,9 (6,13)	21,9 (6,70)	0,796
Índice de Discriminação (ID)	-21,4 (10,36)	-17,7 (24,70)	-22,8 (12,80)	0,868

Resultados apresentados em média (desvio padrão). N = 6. Para dados com distribuição normal e homogeneidade de variâncias, teste ANOVA com post hoc de Bonferroni. Para dados não paramétricos, teste de Kruskal-Wallis com post hoc de Dunn. Os valores negativos de ID refletem a menor interação com o objeto C em relação ao objeto B. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

6.3.4 Medo ao Contexto (MC)

No teste de MC foi realizada a quantificação e comparação dos resultados em relação aos 3 dias. No primeiro dia, não houve diferença entre os grupos (**Tabelas 12**).

Tabela 12. Resultados para o primeiro dia do teste Medo ao Contexto dos animais submetidos a tratamento com DP, DCC e DCM durante 100 dias de intervenção.

Variáveis	DP	DCC	DCM	P
Número de paradas comportamentais entre os minutos 0 e 1	0,083 (0,20)	0,917 (0,97)	0,167 (0,41)	0,082
Número de paradas comportamentais entre os minutos 1 e 2	2,333 (2,18)	3,000 (1,61)	1,167 (1,83)	0,267
Número de paradas comportamentais durante o som	5,667 (1,25)	7,667 (2,18)	5,417 (1,11)	0,100
Número de paradas comportamentais após o choque	6,250 (2,77)	6,167 (2,23)	5,417 (0,92)	0,759

Resultados apresentados em média (desvio padrão). N = 6. Para dados com distribuição normal e homogeneidade de variâncias, teste ANOVA com post hoc de Bonferroni. Para dados não paramétricos, teste de Kruskal-Wallis com post hoc de Dunn. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

No segundo dia do teste, entre os minutos 1 e 2, encontramos um maior número de paradas comportamentais (**Figura 29**) nos animais do grupo DCC em relação aos grupos DP ($p=0,016$) e DCM ($p= 0,038$).

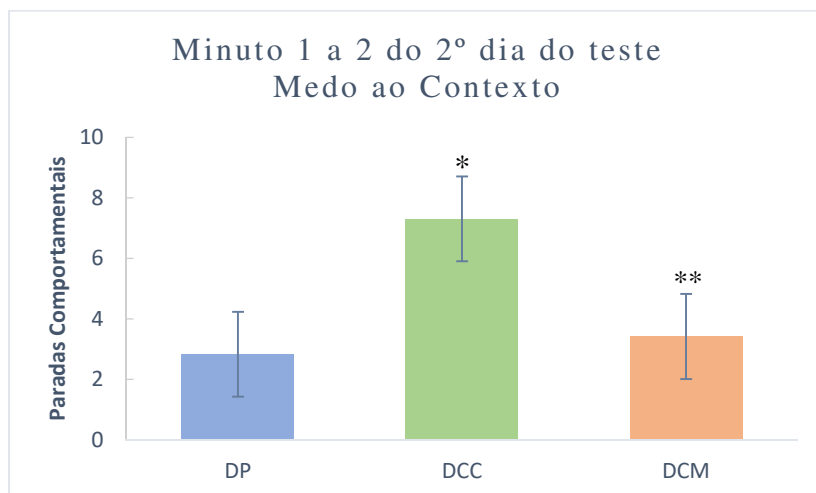


Figura 29. Minuto 1 a 2 do segundo dia do teste de Medo ao Contexto. *Diferença em relação ao grupo DP. ** Diferença em relação ao grupo DCC. Resultados apresentados em média (erro padrão da média). $N = 6, 5$ e 6 , respectivamente. Para dados com distribuição normal e homogeneidade de variâncias, teste ANOVA com post hoc de Bonferroni. Para dados não paramétricos, teste de Kruskal-Wallis com post hoc de Dunn. O nível de significância adotado foi de $p<0,05$.

Também houve diferença entre os minutos 3 e 4, momento em que os animais do grupo DCM ($p=0,033$) tiveram menos paradas comportamentais que os animais do grupo DP (**Figura 30**).

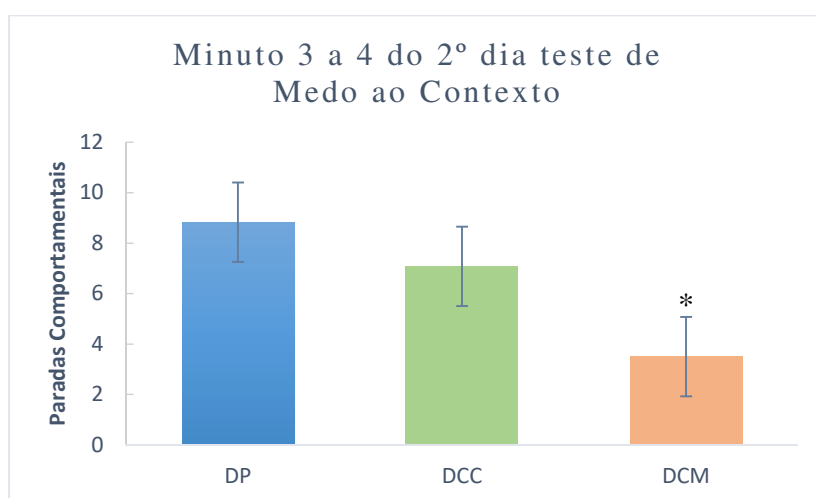


Figura 30. Minuto 3 a 4 do segundo dia do teste de Medo ao Contexto. *Diferença em relação ao grupo DP. Resultados apresentados em média (erro padrão da média). $N = 6, 5$ e 6 , respectivamente. Para dados com distribuição normal e homogeneidade de

variâncias, teste ANOVA com post hoc de Bonferroni. Para dados não paramétricos, teste de Kruskal-Wallis com post hoc de Dunn. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

Nos outros momentos não foi verificada nenhuma outra diferença significativa (Tabela 13).

Tabela 13. Resultados para o segundo dia do teste Medo ao Contexto dos animais submetidos a tratamento com DP, DCC e DCM durante 100 dias de intervenção.

Variáveis	DP	DCC	DCM	P
Número de paradas comportamentais entre os minutos 0 e 1	3,1 (2,90)	4,3 (2,59)	5,2 (1,21)	0,349
Número de paradas comportamentais entre os minutos 1 e 2	2,8 (1,75)	7,3 (3,15)*	3,4 (1,74)**	0,012
Número de paradas comportamentais entre os minutos 2 e 3	5,5 (3,39)	5,2 (2,71)	4,2 (2,04)	0,575
Número de paradas comportamentais entre os minutos 3 e 4	8,8 (3,78)	5,5 (1,58)	3,5 (3,39)*	0,033

*Diferença em relação ao grupo DP. ** Diferença em relação ao grupo DCM. Resultados apresentados em média (desvio padrão). N = 6, 5 e 6, respectivamente. Para dados com distribuição normal e homogeneidade de variâncias, teste ANOVA com post hoc de Bonferroni. Para dados não paramétricos, teste de Kruskal-Wallis com post hoc de Dunn. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

No terceiro dia, não houve diferença para os parâmetros nos momentos avaliados (Tabela 14).

Tabela 14. Resultados para o terceiro dia do teste Medo ao Contexto dos animais submetidos a tratamento com DP, DCC e DCM durante 100 dias de intervenção.

Variáveis	DP	DCC	DCM	P
Número de paradas comportamentais entre os minutos 0 e 1	4,0 (1,82)	3,2 (0,57)	2,6 (2,08)	0,333
Número de paradas comportamentais entre os minutos 1 e 2	6,2 (3,14)	5,3 (1,72)	4,1 (2,27)	0,333
Número de paradas comportamentais durante o Som-1 (30seg)	6,2 (0,61)	5,5 (2,81)	4,2 (1,47)	0,084
Número de paradas comportamentais após o Som-1 (30seg)	2,5 (1,95)	2,0 (1,41)	2,8 (1,17)	0,651
Número de paradas comportamentais durante o Som-2 (30seg)	3,2 (0,75)	4,2 (2,75)	4,6 (1,36)	0,244
Número de paradas comportamentais após o Som-2 (30seg)	3,3 (2,79)	2,8 (2,21)	3,6 (1,24)	0,833

Resultados apresentados em média (desvio padrão). N = 6. Para dados com distribuição normal e homogeneidade de variâncias, teste ANOVA com post hoc de Bonferroni. Para dados não paramétricos, teste de Kruskal-Wallis com post hoc de Dunn. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

6.4 PET/CT

O total da captação de FDG 18-F foi significativamente superior nos grupos DCC (p=0,012) e DCM (p=<0,001) em relação ao grupo DP. Esse perfil se manteve significativo para todos os compartimentos cerebrais avaliados (**Tabela 15**). No grupo DCC, a única exceção em que não se encontraram diferenças foi no córtex médio pré-frontal (**Tabela 15**).

Tabela 15. Captação de FDG-18 nos compartimentos cerebrais dos animais submetidos a tratamento com DP, DCC e DCM durante 100 dias de intervenção.

Compartimento cerebral	DP	DCC	DCM	p
Núcleo Accumbens (Acb)	0,91 (1,24)	3,08 (1,31)*	4,75 (1,11)*	0,001
Amígdala	0,02 (0,01)	2,14 (1,00)*	2,95 (0,87)*	0,005
Putâmen Caudado	0,03 (0,01)	3,30 (1,40)*	4,73 (1,23)*	0,005
Córtex Auditivo	0,02 (0,01)	2,41 (1,01)*	3,37 (0,95)*	<0,001
Córtex Cingulado	0,04 (0,02)	3,31 (1,34)*	4,72 (1,15)*	0,005
Córtex Entorrinal	0,02 (0,01)	2,14 (1,02)*	3,03 (0,83)*	0,005
Córtex Frontal Associação	0,03 (0,01)	2,20 (0,87)*	3,27 (0,73)*	0,003
Córtex Insular	0,02 (0,01)	2,51 (1,20)*	3,55 (1,04)*	0,006
Córtex Médio Pré-frontal	0,04 (0,02)	3,62 (1,40)	5,46 (1,15)*	0,003
Córtex Motor	0,03 (0,01)	2,58 (1,06)*	3,71 (0,95)*	0,005
Córtex Orbitofrontal	0,04 (0,02)	3,00 (1,15)*	4,47 (0,99)	0,003
Córtex Par A	0,03 (0,01)	2,61 (1,06)*	3,67 (1,09)*	<0,001
Córtex Retro-esplênico	0,03 (0,01)	3,29 (1,34)*	4,54 (1,38)*	0,006
Córtex Somato-sensorial	0,03 (0,01)	3,09 (1,40)*	4,23 (1,29)*	0,006
Córtex Visual	0,03 (0,01)	2,55 (1,03)*	3,62 (1,03)*	0,005
Total do Córtex	0,37 (0,17)	33,32 (13,93)*	47,67 (12,27)*	0,005
Hipocampo Antero-Dorsal	0,04 (0,02)	3,67 (1,49)*	5,14 (1,37)*	0,005
Hipocampo Posterior	0,03 (0,01)	3,20 (1,32)*	4,34 (1,16)*	0,005
Total Hipocampo	0,07 (0,03)	6,87 (2,81)*	9,48 (2,53)*	0,005
Hipotálamo	0,03 (0,01)	2,71 (1,15)*	3,81 (0,89)*	0,006
Bulbo Olfativo	0,03 (0,01)	3,01 (1,32)*	4,53 (1,04)*	0,005
Colículo Superior	0,04 (0,02)	3,82 (1,64)*	5,32 (1,51)*	0,005
Mesencéfalo	0,03 (0,01)	3,59 (1,52)*	5,08 (1,43)*	0,005
Área Tegmental Ventral	0,03 (0,01)	3,15 (1,36)*	4,44 (1,24)*	0,006
Substância Cinzenta	0,04 (0,02)	3,34 (1,52)*	4,73 (1,43)*	<0,001
Substância Branca	0,04 (0,02)	3,60 (1,66)*	5,06 (1,54)*	0,006
Colículo Inferior	0,04 (0,02)	4,25 (1,83)*	5,73 (1,75)*	0,006
Tálamo	0,04 (0,02)	3,80 (1,51)*	5,27 (1,32)*	0,005
Pituitária	0,02 (0,01)	1,91 (0,84)*	2,76 (0,65)*	0,005
Fluxo Sanguíneo Cerebral	0,04 (0,02)	3,67 (1,81)*	5,34 (1,75)*	<0,001
Canal PAG Central	0,03 (0,02)	3,64 (1,52)*	5,22 (1,42)*	0,005
Ponte	0,02 (0,01)	2,30 (1,02)*	3,32 (0,90)*	0,006
Septo	0,04 (0,02)	3,68 (1,59)*	5,28 (1,25)*	0,006
Medula	0,04 (0,02)	2,51 (1,18)*	3,61 (0,97)*	0,005
FDG_Total	1,03 (0,47)	97,69 (41,80)*	139,11 (37,75)*	0,006

*Diferença em relação ao grupo DP. Resultados apresentados em média (desvio padrão). N = 5, 5 e 6 Respectivamente. Para dados com distribuição normal e homogeneidade de variâncias, teste ANOVA com post hoc de Bonferroni. Para dados não paramétricos, teste de Kruskal-Wallis com post hoc de Dunn. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

6.5 Análise de Ácidos Graxos

Foram analisados 35 ácidos graxos comparados ao padrão FAME. Os resultados foram obtidos a partir dos extratos lipídicos do lobo frontal e do hipocampo. Para efeito de comparação, somaram-se os percentuais de área do conjunto dos 15 ácidos graxos saturados, dos 9 ácidos graxos monoinsaturados e dos 11 ácidos graxos poli-insaturados. Foram calculados ainda, o índice $\omega 3$ e a relação $\omega 6/\omega 3$.

6.5.1 Lobo Frontal

O conteúdo total de ácidos graxos saturados (**Figura 31**) foi maior no grupo DCC em relação ao grupo DCM ($p=0,026$). Quanto ao conteúdo individual, os ácidos graxos butírico e capríco tiveram área maior no grupo DP em relação ao grupo DCC ($p=0,004$ e $p=0,003$) e DCM ($p=0,029$ e $p=0,012$). O ácido mirístico ($p=0,014$) apresentou conteúdo menor no grupo DCM em relação ao grupo DP. Já o ácido araquídico ($p=0,035$) e o ácido lignocérico ($p=0,011$) tiveram área maior no grupo DCM do que no grupo DP (**Tabela 16**).

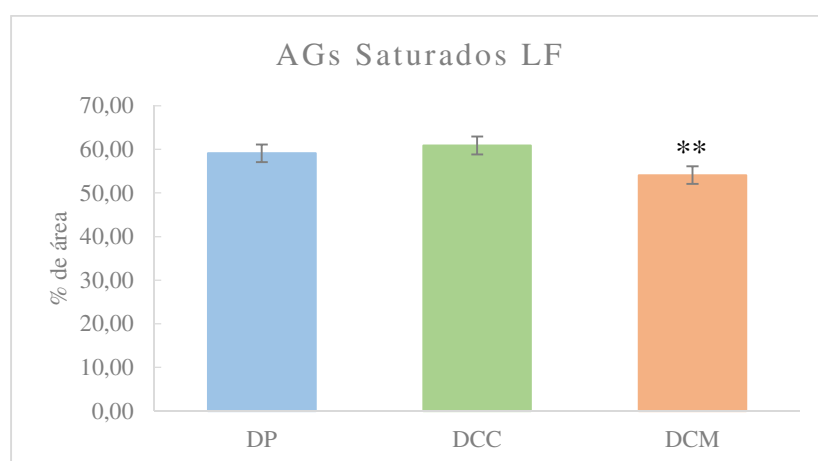


Figura 31. Total de ácidos graxos saturados no LF. **Diferença em relação ao grupo DCC. Resultados apresentados em média (erro padrão da média). N = 6. Para dados com distribuição normal e homogeneidade de variâncias, teste ANOVA com post hoc de Bonferroni. Para dados não paramétricos, teste de Kruskal-Wallis com post hoc de Dunn. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

Tabela 16. Ácidos graxos saturados no lobo frontal dos animais submetidos a tratamento com DP, DCC e DCM durante 100 dias de intervenção.

Ácidos Graxos	DP	DCC	DCM	P
C4:0 Ácido Butírico	4,45 (2,50)	1,88 (0,63)*	2,16 (0,39)*	0,024
C6:0 Ácido Capríco	0,15 (0,05)	0,05 (0,03)*	0,06 (0,03)*	0,015
C8:0 Ácido Caprílico	0,13 (0,06)	0,16 (0,03)	0,18 (0,05)	0,201
C10:0 Ácido Cáprico	0,08 (0,03)	0,05 (0,03)	0,04 (0,01)	0,077
C11:0 Ácido Undecanóico	0,06 (0,02)	0,05 (0,02)	0,06 (0,01)	0,489
C12:0 Ácido Láurico	0,54 (0,11)	0,38 (0,20)	0,32 (0,15)	0,060
C14:0 Ácido Mirístico	0,57 (0,15)	0,42 (0,23)	0,26 (0,09)*	0,016
C15:0 Ácido Pentadecanóico	0,04 (0,01)	0,06 (0,01)	0,04 (0,02)	0,045
C16:0 Ácido Palmítico	27,65 (2,97)	29,66 (3,33)	25,93 (2,75)	0,136
C17:0 Ácido Heptadecanóico	0,21 (0,06)	0,24 (0,03)	0,23 (0,03)	0,517
C18:0 Ácido Esteárico	24,14 (1,56)	26,72 (3,71)	23,24 (1,44)	0,068
C20:0 Ácido Araquídico	0,21 (0,09)	0,27 (0,06)	0,33 (0,06)*	0,037
C21:0 Ácido Heneicosanóico	0,08 (0,08)	0,01 (0,01)	0,02 (0,01)	0,100
C22:0 Ácido Behênico	0,18 (0,07)	0,18 (0,08)	0,29 (0,08)	0,034
C24:0 Ácido Lignocérico	0,62 (0,17)	0,79 (0,17)	0,96 (0,17)*	0,013
Total	59,12 (1,63)	60,91 (5,44)	54,10 (3,70)**	0,023

*Diferença em relação ao grupo DP. ** Diferença em relação ao grupo DCM. Resultados apresentados em média (desvio padrão). N = 6. Para dados com distribuição normal e homogeneidade de variâncias, teste ANOVA com post hoc de Bonferroni. Para dados não paramétricos, teste de Kruskal-Wallis com post hoc de Dunn. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

Ainda no lobo frontal, não houve diferença na soma dos nove ácidos graxos monoinsaturados analisados entre os grupos. Quando se observa os ácidos graxos isoladamente, verifica-se que o grupo DCM teve menor conteúdo de ácido palmitoléico ($p=0,024$) e maior conteúdo de ácido nervônico ($p=0,007$) em relação ao grupo DP (Tabela 17).

Tabela 17. Ácidos graxos monoinsaturados no lobo frontal dos animais submetidos a tratamento com DP, DCC e DCM durante 100 dias de intervenção.

Ácidos Graxos	DP	DCC	DCM	P
C14:1(9) ω 5 Ácido Miristoléico	0,03 (0,02)	0,03 (0,02)	0,05 (0,02)	0,121
C15:1 Ácido cis-10-pentadecenoico	0,02 (0,01)	0,01 (0,01)	0,01 (0,02)	0,194
C16:1 (9) ω 7 Palmitoléico	0,46 (0,07)	0,39 (0,07)	0,34 (0,04)*	0,025
C17:1 Ácido cis-10-heptadecenoico	0,89 (0,47)	1,26 (0,83)	1,73 (0,63)	0,109
C18:1(9) ω 9 Ácido Oleico	14,44 (2,32)	11,94 (2,93)	14,98 (2,74)	0,145
C18:1 (trans-9) ω 9 Ácido Elaídico	1,71 (0,49)	2,61 (1,71)	2,06 (1,15)	0,697
C20:1 ω 9 15 Ácido cis-11-eicosenoico	1,05 (0,22)	1,01 (0,23)	1,16 (0,36)	0,792
C22:1(13) ω 9 Ácido Erúcico	0,12 (0,06)	0,13 (0,06)	0,26 (0,27)	0,472
C24:1(15) ω 9 Ácido Nervônico	0,54 (0,20)	0,82 (0,19)	0,92 (0,15)*	0,007
Total	19,24 (2,42)	18,27 (2,77)	21,51 (3,20)	0,157

*Diferença em relação ao grupo DP. ** Diferença em relação ao grupo DCM. Resultados apresentados em média (desvio padrão). N = 6. Para dados com distribuição normal e

homogeneidade de variâncias, teste ANOVA com post hoc de Bonferroni. Para dados não paramétricos, teste de Kruskal-Wallis com post hoc de Dunn. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

Em relação ao conjunto dos ácidos graxos poli-insaturados analisados, o grupo DCM apresentou um valor maior que o grupo DCC ($p=0,026$, **Figura 32**). Quanto ao índice $\omega 3$ e à relação $\omega 6/\omega 3$, não houve diferença entre os grupos no lobo frontal (**Tabela 18**). Individualmente, as diferenças aconteceram em áreas inferiores a 1%. O ácido linolelaídico apresentou área maior no grupo DCM em relação ao grupo DP ($p < 0,001$) e também maior no grupo DCC em relação ao grupo DP ($p=0,019$). Já o ácido di-homo- γ -linolênico apresentou-se em maior concentração no grupo DCM em relação ao grupo DCC (0,020).

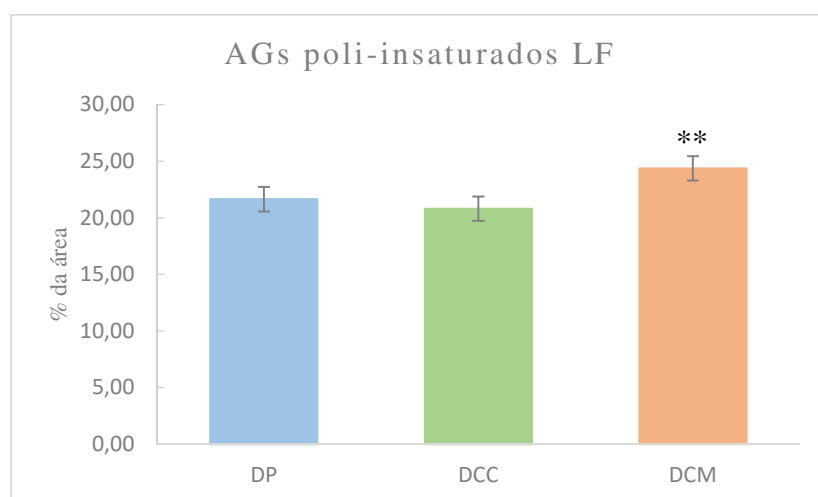


Figura 32. Total de ácidos graxos poli-insaturados no LF. **Diferença em relação ao grupo DCC. Resultados apresentados em média (erro padrão da média). N = 6. Para dados com distribuição normal e homogeneidade de variâncias, teste ANOVA com post hoc de Bonferroni. Para dados não paramétricos, teste de Kruskal-Wallis com post hoc de Dunn. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

Tabela 18. Ácidos graxos poli-insaturados no lobo frontal dos animais submetidos a tratamento com DP, DCC e DCM durante 100 dias de intervenção.

Ácidos Graxos	DP	DCC	DCM	P
C18:2(9,12) $\omega 6$ Ácido Linoleico	1,39 (1,02)	1,21 (0,09)	1,94 (1,77)	0,394
C18:2 (trans-9, trans-12) $\omega 6$				
Ácido Linolelaídico	0,03 (0,01)	0,07 (0,03)*	0,18 (0,15)*	0,003
C18:3(6,9,12) $\omega 6$				
Ácido γ -linolênico	0,03 (0,02)	0,04 (0,04)	0,01 (0,01)	0,164
C18:3(9, 12, 15) $\omega 3$				
Ácido α -linolênico	0,04 (0,05)	0,02 (0,02)	0,09 (0,20)	0,493
C20:2(11, 14) $\omega 6$				
Ácido Eicosadienóico	0,12 (0,11)	0,18 (0,14)	0,76 (1,04)	0,423
C20:3(8, 11, 18) $\omega 6$				

Ácido di-homo- γ -linolênico C20:4(5,8,11,14) ω 6	0,34 (0,09)	0,31 (0,05)	0,47 (0,12)**	0,016
Ácido Araquidônico C20:3(11,14,17) ω 3	9,68 (0,95)	9,18 (1,48)	9,68 (0,95)	0,783
Ácido di-homo- α -linolênico C20:5(5,8, 11,14,17) ω 3	0,05 (0,07)	0,02 (0,02)	0,02 (0,02)	0,423
Ácido Eicosapentaenoico (EPA) C22:2(13, 16) ω 6	0,03 (0,04)	0,09 (0,04)	0,04 (0,05)	0,054
Ácido Docosadienóico C22:6(4,7,10,13,16,19) ω 3	0,03 (0,08)	0,00 (0,01)	0,01 (0,02)	0,289
Ácido Docosahexaenóico (DHA)	9,91 (1,50)	9,72 (1,51)	11,42 (1,36)	0,119
Relação ω 6/ ω 3	1,17 (0,17)	1,13 (0,13)	1,12 (0,24)	0,886
Índice ω 3	9,94 (1,50)	9,81 (1,54)	11,46 (1,38)	0,129
Total	21,65 (1,73)	20,81 (2,79)	24,39 (1,38)**	0,022

*Diferença em relação ao grupo DP. ** Diferença em relação ao grupo DCM. Resultados apresentados em média (desvio padrão). N = 6. Para dados com distribuição normal e homogeneidade de variâncias, teste ANOVA com post hoc de Bonferroni. Para dados não paramétricos, teste de Kruskal-Wallis com post hoc de Dunn. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

6.5.2 Hipocampo

No hipocampo, o total de ácidos graxos saturados foi menor no grupo DCM em relação ao grupo DCC ($p < 0,001$, **Figura 33**). O conteúdo de ácido butírico foi menor no grupo DCM em relação aos grupos DP ($p = 0,026$) e DCC ($p < 0,001$), e maior no grupo DCC em relação ao grupo DP (0,026). Já o ácido caprótico, teve área menor no grupo DCM em relação aos grupos DP ($p = 0,024$) e DCC ($p < 0,001$). O ácido caprílico foi mais abundante no grupo DCC em relação aos grupos DP ($p = 0,006$) e DCM ($p < 0,001$). O ácido pentadecanóico teve menor concentração no grupo DCM comparado ao grupo DCC (0,003). O ácido heptadecanóico teve menor concentração no grupo DCM em relação aos grupos DP ($p = 0,009$) e DCC ($p < 0,001$). Houve ainda dois ácidos graxos com área inferior no grupo DCC em relação ao grupo DP. Foram os ácidos araquídico ($p = 0,015$) e heneicosanóico ($p = 0,005$, **Tabela 19**)

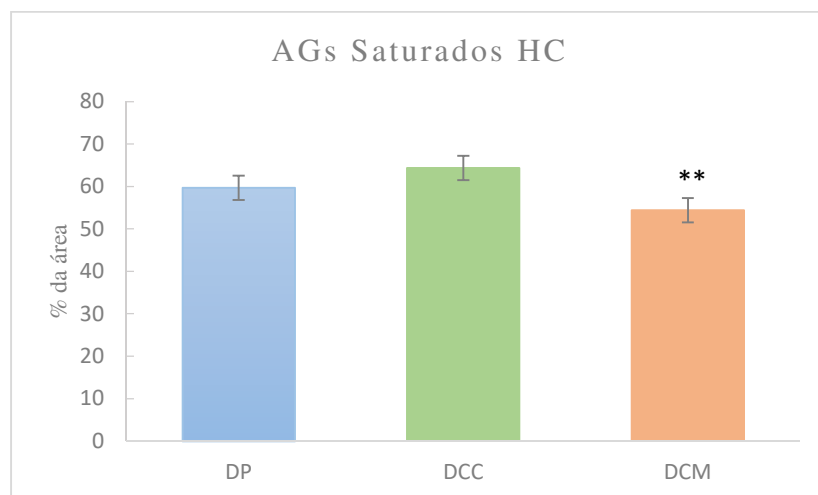


Figura 33. Total de ácidos graxos saturados no HC. **Diferença em relação ao grupo DCC. Resultados apresentados em média (erro padrão da média). N = 6. Para dados com distribuição normal e homogeneidade de variâncias, teste ANOVA com post hoc de Bonferroni. Para dados não paramétricos, teste de Kruskal-Wallis com post hoc de Dunn. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

Tabela 19. Ácidos graxos saturados no hipocampo dos animais submetidos a tratamento com DP, DCC e DCM durante 100 dias de intervenção.

Ácidos Graxos	DP	DCC	DCM	P
C4:0 Ácido Butírico	3,38 (1,64)	10,75 (2,11)*	0,97 (0,45)***	<0,001
C6:0 Ácido Caprício	0,11 (0,06)	0,21 (0,12)	0,04 (0,03)***	0,005
C8:0 Ácido Caprílico	0,16 (0,06)	0,35 (0,11)*	0,11 (0,08)**	<0,001
C10:0 Ácido Cáprico	0,19 (0,12)	0,18 (0,07)	0,10 (0,07)	0,228
C11:0 Ácido Undecanóico	0,02 (0,01)	0,04 (0,01)	0,02 (0,2)	0,050
C12:0 Ácido Láurico	0,22 (0,18)	0,31 (0,19)	0,29 (0,24)	0,567
C14:0 Ácido Mirístico	0,61 (0,26)	0,73 (0,30)	0,52 (0,20)	0,402
C15:0 Ácido Pentadecanóico	0,08 (0,02)	0,12 (0,04)	0,06 (0,02)**	0,022
C16:0 Ácido Palmítico	22,84 (2,20)	20,67 (0,57)	22,20 (2,35)	0,157
C17:0 Ácido Heptadecanóico	0,74 (0,15)	1,43 (1,07)	0,38 (0,11)***	0,003
C18:0 Ácido Esteárico	27,86 (1,83)	27,17 (3,16)	26,05 (1,52)	0,404
C20:0 Ácido Araquídico	0,70 (0,17)	0,36 (0,15)*	0,55 (0,21)	0,017
C21:0 Ácido Heneicosanóico	0,05 (0,02)	0,02 (0,09)*	0,04 (0,03)	0,032
C22:0 Ácido Behênico	1,29 (1,05)	0,66 (0,24)	1,34 (0,75)	0,130
C24:0 Ácido Lignocérico	1,45 (0,45)	1,38 (0,26)	1,73 (0,76)	0,860
Total	59,69 (2,75)	64,36 (4,60)	54,39 (2,57)**	<0,001

*Diferença em relação ao grupo DP. ** Diferença em relação ao grupo DCM. Resultados apresentados em média (desvio padrão). N = 6. Para dados com distribuição normal e homogeneidade de variâncias, teste ANOVA com post hoc de Bonferroni. Para dados não paramétricos, teste de Kruskal-Wallis com post hoc de Dunn. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

A exemplo do que ocorreu no lobo frontal, não foi possível identificar diferença na somatória dos nove ácidos graxos monoinsaturados analisados entre os grupos no hipocampo, já que, embora o “p” do teste ANOVA tenha sido significativo ($p = 0,044$),

não houve diferença significativa no teste pós-hoc (**Tabela 20**). Entretanto, somados os ácidos graxos oleico e elaídico, percebe-se um conteúdo mais abundante nos grupos DP (0,017) e DCM (0,045) em relação ao grupo DCC (**Figura 34**). Encontrou-se maior concentração do ácido palmitoléico no grupo DCC em relação ao grupo DP ($p=0,032$). O ácido erúcico foi mais abundante no grupo DCM em relação ao grupo DCC (0,033).

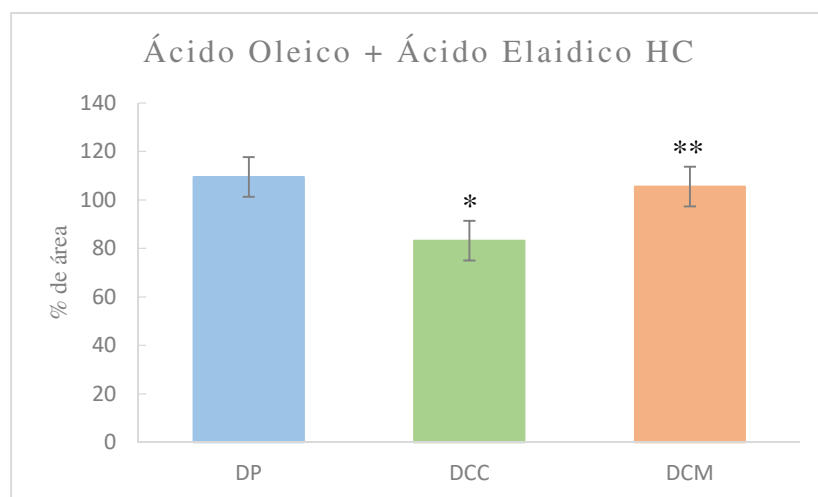


Figura 34. Soma dos percentuais de área dos ácidos oleico e elaídico no HC. *Diferença em relação ao grupo DP. **Diferença em relação ao grupo DCC. Resultados apresentados em média (erro padrão da média). N = 6. Para dados com distribuição normal e homogeneidade de variâncias, teste ANOVA com post hoc de Bonferroni. Para dados não paramétricos, teste de Kruskal-Wallis com post hoc de Dunn. O nível de significância adotado foi de $p<0,05$.

Tabela 20. Ácidos graxos monoinsaturados no hipocampo dos animais submetidos a tratamento com DP, DCC e DCM durante 100 dias de intervenção.

Ácidos Graxos	DP	DCC	DCM	p
C14: 1(9) ω 5 Ácido Miristoléico	0,10 (0,06)	0,15 (0,10)	0,10 (0,09)	0,482
C15:1 Ácido cis-10-pentadecenoico	0,06 (0,07)	0,09 (0,07)	0,05 (0,03)	0,456
C16:1(9) ω 7 Palmitoléico	0,15 (0,03)	0,21 (0,03)*	0,19 (0,03)	0,031
C17:1 Ácido cis-10-heptadecenoico	0,59 (0,26)	1,22 (0,59)	0,68 (0,44)	0,116
C18:1(9) ω 9 Ácido Oleico	14,44 (2,32)	11,94 (2,93)	14,96 (2,74)	0,068
C18:1 (trans-9) ω 9 Ácido Elaídico	1,81 (0,41)	1,30 (0,25)	2,28 (1,85)	0,091
C20:1 ω 9 15 Ácido 5-eicosenoico	1,05 (0,22)	1,09 (0,23)	1,15 (0,38)	0,722
C22:1(13) ω 9 Ácido Erúcico	0,58 (0,22)	0,26 (0,17)	0,75 (0,42)**	0,032
C24: 1(15) ω 9 Ácido Nervônico	1,82 (0,89)	1,19 (0,36)	1,49 (0,75)	0,244
Total	22,76 (2,82)	18,14 (2,36)	22,25 (4,01)	0,044

*Diferença em relação ao grupo DP. ** Diferença em relação ao grupo DCM. Resultados apresentados em média (desvio padrão). N = 6. Para dados com distribuição normal e homogeneidade de variâncias, teste ANOVA com post hoc de Bonferroni. Para dados não paramétricos, teste de Kruskal-Wallis com post hoc de Dunn. O nível de significância adotado foi de $p<0,05$.

A maior concentração de ácidos graxos poli-insaturados do grupo DCM (**Figura 35**) em relação aos grupos DP ($p=0,006$) e DCC ($p=0,006$) reflete diretamente a diferença no percentual de área do DHA (**Figura 36 - A**) também deste grupo com os outros dois ($p=0,019$, para o grupo DP e $p=0,003$, para o grupo DCC) e, conseqüentemente, a diferença encontrada no índice $\omega 3$ ($p=0,017$, em relação ao grupo DP e $p=0,004$, em relação ao grupo DCC, **Figura 36 - B**). Além disso, evidenciou-se uma menor relação $\omega 6/\omega 3$ no grupo DCM ($p=0,005$) em relação ao grupo DCC (**Figura 37**). Por outro lado, o ácido α -linolênico teve seu conteúdo menor no grupo DCM em relação aos grupos DP ($p=0,008$) e DCC ($p=0,036$). Já o ácido di-homo- γ -linolênico, teve área menor nos grupos DP ($p=0,042$) e DCM ($p=0,002$) em relação ao grupo DCC (**Tabela 21**).

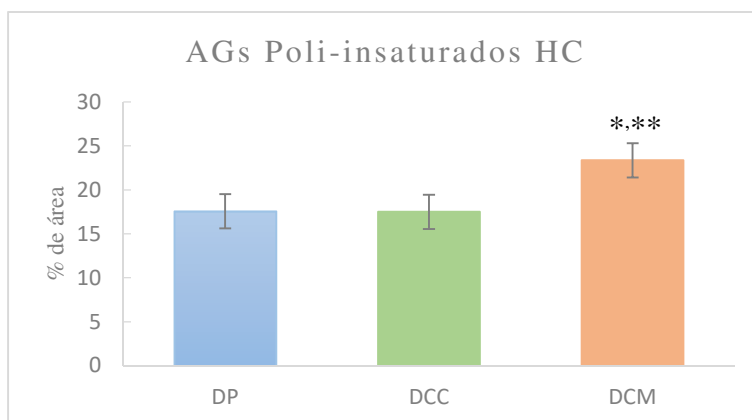


Figura 35. Total de ácidos graxos poli-insaturados no HC. *Diferença em relação ao grupo DP. **Diferença em relação ao grupo DCC. Resultados apresentados em média (erro padrão da média). N = 6. Para dados com distribuição normal e homogeneidade de variâncias, teste ANOVA com post hoc de Bonferroni. Para dados não paramétricos, teste de Kruskal-Wallis com post hoc de Dunn. O nível de significância adotado foi de $p<0,05$.

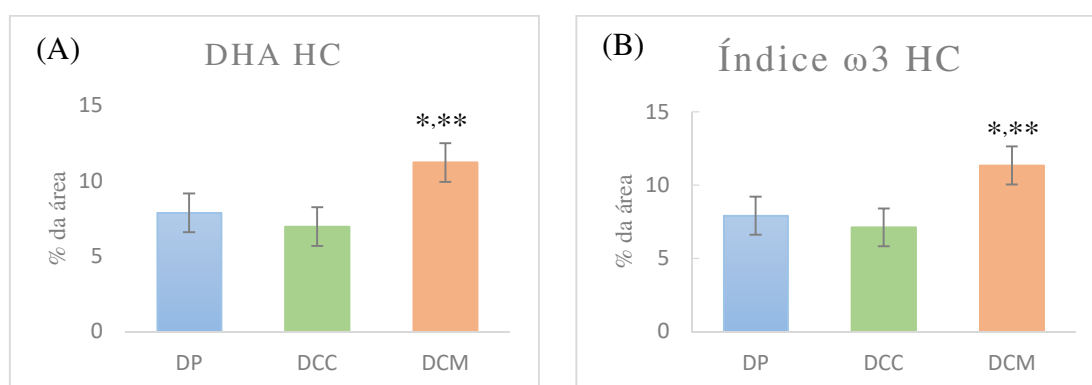


Figura 36. DHA e Índice $\omega 3$ no HC. *Diferença em relação ao grupo DP. **Diferença em relação ao grupo DCC. Resultados apresentados em média (erro padrão da média). N = 6. Para dados com distribuição normal e homogeneidade de variâncias, teste ANOVA com post hoc de Bonferroni. Para dados não paramétricos, teste de Kruskal-Wallis com post hoc de Dunn. O nível de significância adotado foi de $p<0,05$.

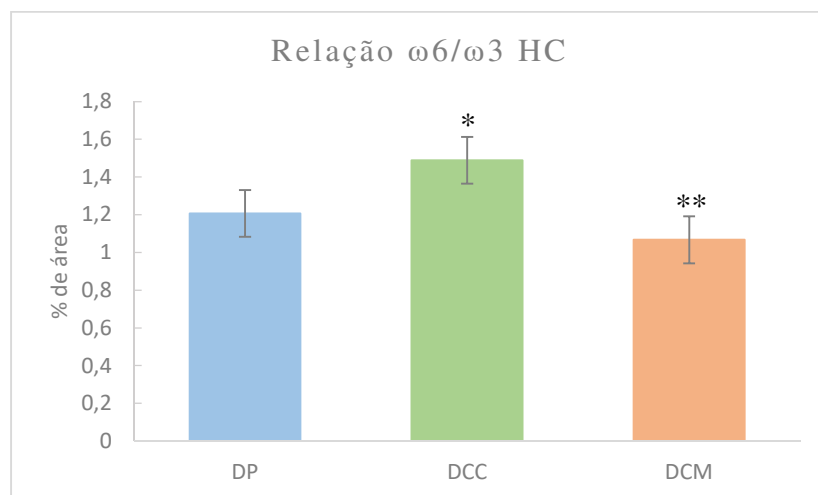


Figura 37. Relação $\omega 6/\omega 3$ no HC. **Diferença em relação ao grupo DCC. Resultados apresentados em média (erro padrão da média). N = 6. Para dados com distribuição normal e homogeneidade de variâncias, teste ANOVA com post hoc de Bonferroni. Para dados não paramétricos, teste de Kruskal-Wallis com post hoc de Dunn. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

Tabela 21. Ácidos graxos poli-insaturados no hipocampo dos animais submetidos a tratamento com DP, DCC e DCM durante 100 dias de intervenção.

Ácidos Graxos	DP	DCC	DCM	P
C18:2(9,12) $\omega 6$ Ácido Linoleico	0,93 (0,40)	1,11 (0,52)	1,18 (0,21)	0,567
C18:2 (trans-9, trans-12) $\omega 6$				
Ácido Linolelaídico	0,05 (0,02)	0,09 (0,06)	0,06 (0,05)	0,347
C18:3(6,9,12) $\omega 6$				
Ácido γ -linolênico	0,04 (0,05)	0,04 (0,02)	0,05 (0,08)	0,451
C18:3(9, 12, 15) $\omega 3$				
Ácido α -linolênico	0,11 (0,13)	0,11 (0,12)	0,01 (0,00)***	0,042
C20:2(11, 14) $\omega 6$				
Ácido Eicosadienóico	0,06 (0,03)	0,17 (0,18)	0,11 (0,05)	0,097
C20:3(8, 11, 18) $\omega 6$				
Ácido di-homo- γ -linolênico	0,67 (0,26)	1,07 (0,49)*	0,53 (0,13)**	0,018
C20:4(5,8,11,14) $\omega 6$				
Ácido Araquidônico	7,64 (1,73)	7,68 (1,61)	9,61 (1,50)	0,065
C20:3(11,14,17) $\omega 3$				
Ácido di-homo- α -linolênico	0,05 (0,07)	0,05 (0,05)	0,02 (0,01)	0,349
C20:5(5,8, 11,14,17) $\omega 3$				
Ácido Eicosapentaenoico (EPA)	0,03 (0,04)	0,14 (0,22)	0,11 (0,13)	0,150
C22:2(13, 16) $\omega 6$				
Ácido Docosadienóico	0,09 (0,11)	0,09 (0,10)	0,45 (0,60)	0,300
C22:6(4,7,10,13,16,19) $\omega 3$				
Ácido Docosahexaenóico (DHA)	7,89 (2,06)	6,97 (1,75)	11,23 (1,62)***	0,003
Relação $\omega 6/\omega 3$	1,21 (0,17)	1,49 (0,42)	1,07 (0,12)**	0,032
Índice $\omega 3$	7,92 (2,06)	7,11 (1,88)	11,34 (1,53)***	0,003
Total	17,55 (3,45)	17,50 (2,41)	23,37 (2,07)***	0,002

*Diferença em relação ao grupo DP. ** Diferença em relação ao grupo DCM. Resultados apresentados em média (desvio padrão). N = 6. Para dados com distribuição normal e homogeneidade de variâncias, teste ANOVA com post hoc de Bonferroni. Para dados não paramétricos, teste de Kruskal-Wallis com post hoc de Dunn. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

6.6 Parâmetros bioquímicos, inflamatórios e oxidativos

6.6.1 Parâmetros bioquímicos

Evidenciou-se que o conteúdo de GABA no LF foi menor no grupo DCM do que nos grupos DP ($p=0,029$) e DCC ($p=0,002$). Entretanto, não houve diferença nos valores de BDNF entre os grupos (**Tabela 22**).

Tabela 22. Concentração de parâmetros bioquímicos no lobo frontal e no hipocampo dos animais submetidos a tratamento com DP, DCC e DCM durante 100 dias de intervenção.

Marcador	DP	DCC	DCM	P
<i>Lobo Frontal</i>				
BDNF (pg/mg)	267,94 (86,80)	262,84 (127,75)	225,30 (110,76)	0,767
GABA (pg/mg)	50,25 (17,33)	92,03 (83,65)	22,03 (17,67) ^{***}	0,014
<i>Hipocampo</i>				
BDNF (pg/mg)	105,03 (20,95)	121,04 (24,52)	133,46 (39,69)	0,277
GABA (pg/mg)	156,55 (61,16)	133,84 (83,72)	88,37 (43,77)	0,214

^{**}Diferença em relação ao grupo DCC. Resultados apresentados em média (desvio padrão). N = 6. Para dados com distribuição normal e homogeneidade de variâncias, teste ANOVA com post hoc de Bonferroni. Para dados não paramétricos, teste de Kruskal-Wallis com post hoc de Dunn. O nível de significância adotado foi de $p<0,05$.

6.6.2 Parâmetros Inflamatórios

No lobo frontal, a produção de IL1- β , IL-6 e IL-10 foi menor para os grupos DCC ($p=0,002$, $p<0,001$ e $p=0,003$, respectivamente) e DCM ($p=0,003$, $0,047$ e $0,002$, respectivamente) em relação ao grupo DP (**Figura 38**). Não houve diferença significativa para o TNF- α no lobo frontal (**Tabela 23**).

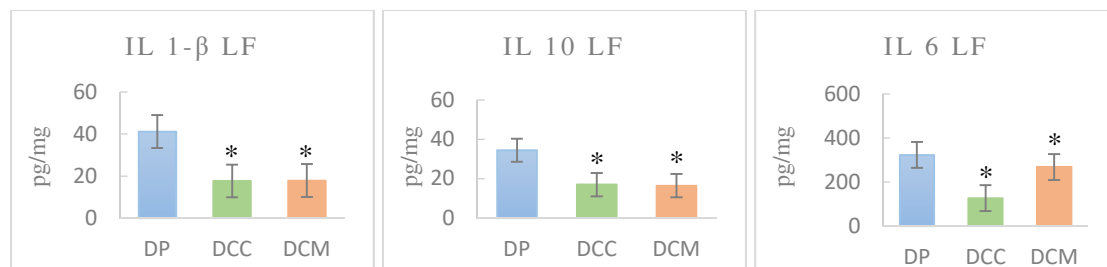


Figura 38. IL 1- β , IL 10 e IL 6 no LF. *Diferença em relação ao grupo DP. **Diferença em relação ao grupo DCC. Resultados apresentados em média (erro padrão da média). N = 6. Para dados com distribuição normal e homogeneidade de variâncias, teste ANOVA com post hoc de Bonferroni. Para dados não paramétricos, teste de Kruskal-Wallis com post hoc de Dunn. O nível de significância adotado foi de $p<0,05$.

No hipocampo, a produção de IL1- β foi menor no grupo DCM ($p=0,005$) em relação ao grupo DP (**Figura 39 - A**). A IL6 foi menor nos grupos DCC ($p=0,010$) e DCM ($<0,001$) em relação ao DP (**Figura 39 - B**). Não foram evidenciadas diferenças significativas entre os grupos quando avaliamos a IL10 e o TNF- α (**Tabela 23**).

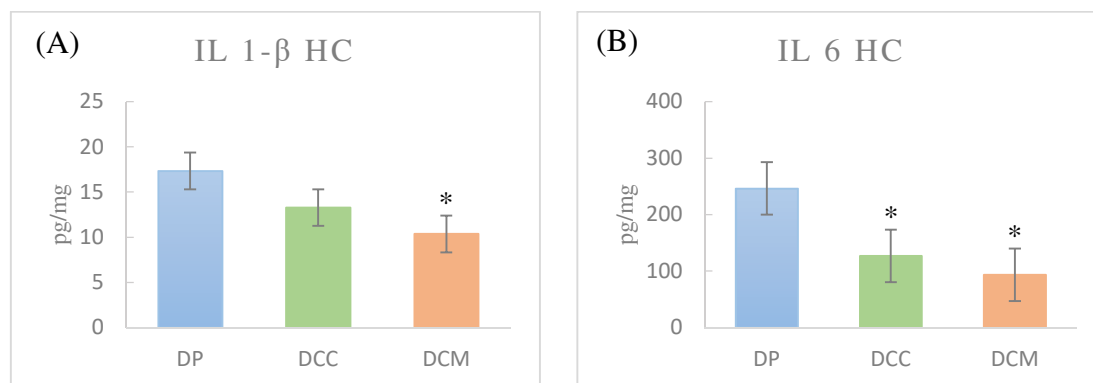


Figura 39. IL 1- β e IL 6 no HC. *Diferença em relação ao grupo DP. Resultados apresentados em média (erro padrão da média). N = 6. Para dados com distribuição normal e homogeneidade de variâncias, teste ANOVA com post hoc de Bonferroni. Para dados não paramétricos, teste de Kruskal-Wallis com post hoc de Dunn. O nível de significância adotado foi de $p<0,05$.

Tabela 23. Concentração de marcadores relacionados à inflamação no lobo frontal e no hipocampo dos animais submetidos a tratamento com DP, DCC e DCM durante 100 dias de intervenção.

Variáveis	DP	DCC	DCM	P
Lobo Frontal				
IL1- β (pg/mg)	41,22 (11,56)	17,62 (7,43)*	17,87 (8,29)*	0,005
IL6 (pg/mg)	323,24 (97,36)	126,72 (57,08)*	268,18 (275,57)*	0,006
IL10 (pg/mg)	34,48 (6,32)	16,97 (7,66)*	16,47 (6,83)*	<0,001
TNF- α (pg/mg)	1,87 (0,35)	1,24 (0,39)	1,58 (0,60)	0,089
ND (ng/mg)	5,83 (1,13)	5,61 (1,21)	5,59 (1,00)	0,921
Hipocampo				
IL1- β (pg/mg)	17,34 (3,29)	13,28 (3,82)	10,36 (2,26)*	0,006
IL6 (pg/mg)	246,28 (104,02)	126,89 (17,61)*	93,34 (47,61)*	0,003
IL10 (pg/mg)	20,18 (5,10)	16,96 (3,82)	14,25 (4,21)	0,098
TNF- α (pg/mg)	1,06 (0,23)	0,94 (0,33)	0,74 (0,71)	0,067
ND (ng/mg)	4,90 (1,27)	4,32 (0,59)	4,02 (0,64)	0,220

*Diferença em relação ao grupo DP. Resultados apresentados em média (desvio padrão). N = 6. Para dados com distribuição normal e homogeneidade de variâncias, teste ANOVA com post hoc de Bonferroni. Para dados não paramétricos, teste de Kruskal-Wallis com post hoc de Dunn. O nível de significância adotado foi de $p<0,05$.

6.6.3 Parâmetros oxidativos

A concentração de LDLox no LF foi menor nos grupos DCC ($p=0,029$) e DCM ($p<0,001$) em relação ao grupo DP (**Figura 40 – A**). No HC, foi igualmente menor em ambos os grupos, DCC ($p=0,026$) e DCM ($p<0,001$), em relação ao grupo DP (**Figura 40 – B**).

A atividade de CAT foi menor no grupo DCM do que no grupo DP no HC ($p=0,033$, **Figura 40 – C**). Não houve diferença para os demais parâmetros relacionados ao estresse oxidativo (**Tabela 24**).

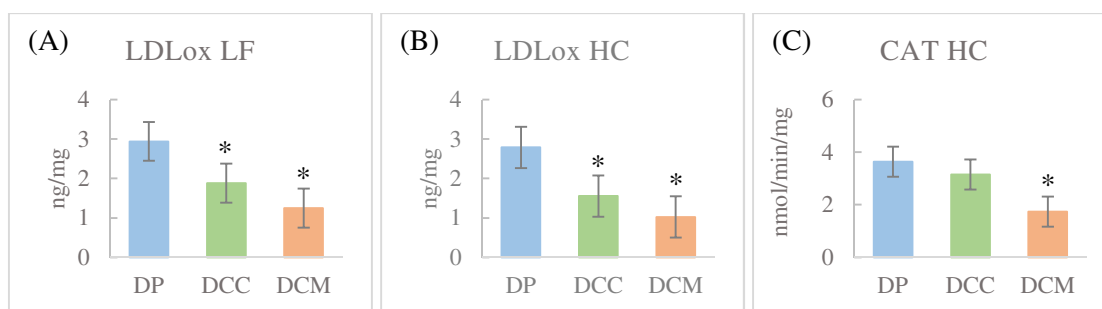


Figura 40. Concentrações de LDLox no LF (A) e no HC (B) e CAT no HC (C). *Diferença em relação ao grupo DP. Resultados apresentados em média (erro padrão da média). N = 6. Para dados com distribuição normal e homogeneidade de variâncias, teste ANOVA com post hoc de Bonferroni. Para dados não paramétricos, teste de Kruskal-Wallis com post hoc de Dunn. O nível de significância adotado foi de $p<0,05$.

Tabela 24. Concentração de marcadores relacionados à oxidação nos compartimentos cerebrais dos animais submetidos a tratamento com DP, DCC e DCM durante 100 dias de intervenção.

Variáveis	DP Média (DP)	DCC Média (DP)	DCM Média (DP)	p
Lobo Frontal				
8OHdG (ng/mg)	1,54 (0,63)	1,38 (0,44)	1,17 (0,22)	0,523
LDLox (ng/mg)	2,94 (0,59)	1,88 (0,52)*	1,25 (0,27)*	<0,001
CAT (nmol/min//mg)	3,59 (1,44)	4,34 (1,87)	3,55 (1,15)	0,608
SOD (U/mg)	53,14 (6,51)	48,38 (10,17)	47,69 (7,34)	0,469
Hipocampo				
8OHdG (ng/mg)	0,84 (0,23)	0,77 (0,79)	0,79 (0,57)	0,692
LDLox (ng/mg)	2,79 (0,89)	1,56 (0,38)*	1,03 (0,18)*	0,002
CAT (nmol/min//mg)	3,64 (1,54)	3,15 (1,10)	1,73 (0,52)*	0,028
SOD (U/mg)	35,03 (5,29)	30,57 (3,95)	30,75 (4,14)	0,187

*Diferença em relação ao grupo DP. Resultados apresentados em média (desvio padrão). N = 6. Para dados com distribuição normal e homogeneidade de variâncias, teste ANOVA com post hoc de Bonferroni. Para dados não paramétricos, teste de Kruskal-Wallis com post hoc de Dunn. O nível de significância adotado foi de $p<0,05$.

7. DISCUSSÃO

Considerando o crescente uso das DC em diferentes contextos de saúde e de doença, o presente estudo contribui no âmbito do impacto da DC na saúde cerebral com ênfase nas possíveis relações entre o eixo inflamação-oxidação e o comportamento. De fato, a conexão entre DC e comportamento tem sido investigada por diversos pesquisadores (SUSSMAN et al, 2014; WŁODARCZYK et al, 2020, DIETCH et al, 2023). Nossos resultados mostraram que ambas as DCC e DCM modularam o comportamento dos animais, embora a maior ênfase tenha sido observada em relação à DCC, cujo consumo levou a um maior índice de ansiedade (IA) e maior número de paradas comportamentais sugestivas de melhora na cognição e memória.

Diversas evidências mostram o efeito promissor da DC nas doenças neurológicas e neurodegenerativas, entretanto, é pouco explorado o papel da qualidade dos ácidos graxos na modulação cerebral. Um estudo mostrou que ratos Wistar machos com cerca de 9 semanas que receberam DC com 90% de gorduras (93,8% de manteiga de cacau e 6,2% de óleo de soja) não apresentaram diferença no nível de ansiedade avaliado por meio do teste de CA, porém apresentaram discreta melhora cognitiva, mensurada pelo seu melhor desempenho no teste do labirinto em Y em relação ao grupo que consumiu uma dieta controle com 10% de gorduras, 10% de proteínas e 80% de carboidratos (FUKUSHIMA et al, 2015). Outro estudo, realizado com camundongos C57BL/6J de 2 a 3 meses de idade, comparou a ingestão de uma DC (90% de gorduras), com elevado teor de manteiga de cacau (93,8%), com uma dieta padrão (10% de gorduras) e não encontrou diferença no nível de ansiedade dos animais, avaliado pelo teste de LCE (HUANG et al, 2019). A manteiga de cacau tem cerca de 72,76% de gorduras saturadas em sua composição, especialmente, os ácidos graxos palmítico e esteárico, com o ácido graxo monoinsaturado oleico sendo o terceiro com maior concentração, conferindo-lhe um percentual de 25,39% de gorduras monoinsaturadas (COHEN e JACKIX, 2009).

Potenciais diferenças na relação da DC com parâmetros comportamentais foram investigados no presente estudo por meio das DCC e DCM. De fato, nossos resultados variaram em função do perfil de AG. Nós observamos um comportamento do tipo ansioso no grupo DCC em relação ao grupo DP no teste do LCE, entretanto, o grupo DCM não teve diferença em relação controle. Essa diferença pode ter relação com o perfil da DCC, que se caracteriza pela elevada concentração de ácidos graxos saturados de origem animal. No LF e no HC, houve mais incorporação de AG saturados no grupo DCC do que

no grupo DCM. No HC, essa diferença ficou mais significativa em relação ao ácido butírico que aumentou cerca de 10x no grupo DCC, quando comparado ao grupo DCM. De maneira semelhante, AQUINO (2019) descreveu maior ansiedade avaliada pelo teste do LCE em camundongos com 52 dias de idade alimentados logo após o desmame com uma dieta com 20% de proteínas, 20% de carboidratos e 60% de gorduras (90,74% de banha de porco) e cujas mães receberam a mesma dieta ao longo da gestação e lactação, em relação aos animais que receberam uma dieta padrão com 20% de proteínas, 65 % de carboidratos e 15% de gorduras. Embora a pesquisadora não tenha utilizado uma DC com 90% de gorduras, a maior parte das gorduras de dieta hiperlipídica era de fonte animal, e, conseqüentemente, rica em ácidos graxos saturados; perfil semelhante ao da DCC usada no presente estudo. Adicionalmente, um estudo focado na relação entre DC e cognição descreveu que uma dieta contendo 90,5% de gorduras (87,18% de gordura vegetal hidrogenada e 12,82 % de óleo de milho) promoveu aumento do comportamento ansioso avaliado pelo teste de LCE após sete dias de ingestão da DCC em camundongos OF1, quando comparado ao controle (10% de gorduras) (RODENAS-GONZALES et al, 2022). É importante destacar que as gorduras *trans* resultantes do processo de hidrogenação de óleos vegetais, além de aumentarem o risco de doenças cardiovasculares, diabetes e câncer (ISLAM et al, 2019), exercem efeitos inflamatórios semelhantes ou até mais intensos que aqueles induzidos pelas gorduras saturadas (HAN et al, 2002). Esses resultados sinalizam para uma resposta dependente do tipo de ácidos graxos presentes na DC, uma vez que gorduras saturadas, principalmente as de fontes animais, e *trans* parecem aumentar também a ansiedade.

No estudo de LING e colaboradores (2019), ratos Sprague-Dowley jovens, com 28 dias de vida e que receberam DC com 70% de gorduras (99,28% de banha de porco) e 30% de proteínas, sem carboidratos, mostraram comportamento ansioso associado a mais autolimpezas no teste de CA em relação ao grupo controle. Nossos resultados no teste de CA foram bastante discretos ou sem diferença entre os grupos, ou seja, não confirmam o papel negativo dos ácidos graxos em relação aos parâmetros específicos desse teste, embora tenham apresentado maior ansiedade no teste de LCE.

Nosso estudo explorou ainda o impacto das DCC e DCM no comportamento dos animais submetidos ao teste de MC. Frente aos estímulos aversivos de som e choque, o grupo DCC apresentou o dobro do número de paradas comportamentais em relação aos grupos DP e DCM no momento 1-2 min do segundo dia do teste, indicando um melhor desempenho cognitivo em relação à memória. Entretanto, essa reação de antecipação ao

estímulo aversivo poderia ser considerada também uma manifestação de ansiedade desses animais (LEZAK et al, 2017). A literatura é escassa em modelos semelhantes ao usado no presente estudo com comparações entre DCC e DCM. Esse fato reforça o caráter de ineditismo do nosso estudo, mas deixa em aberto inúmeras possibilidades a serem exploradas.

Atualmente, a literatura descreve pelo menos cinco mecanismos modulados pela DC (WŁODARCZYK et al, 2020). O estímulo à síntese de GABA é amplamente investigado no contexto das epilepsias fármaco-resistentes, uma vez que esse é o principal neurotransmissor inibitório (PERUCCA et al, 2023). Frente às distintas respostas comportamentais observadas em nosso estudo, nós decidimos explorar como a DCC e a DCM modulavam a síntese de GABA. O grupo DCM apresentou menor concentração de GABA em relação aos grupos DP e DCC, que mostraram perfis semelhantes. Desse modo, concluímos que as mudanças comportamentais não podem ser explicadas pela variação do GABA. Por outro lado, está bem estabelecido na literatura que a subnutrição na infância pode influenciar negativamente diversos aspectos comportamentais, mas com repercussões em diferentes etapas da vida (BLACK, 2018). Considerando essa possibilidade, os três grupos experimentais foram rigorosamente monitorados quanto ao consumo de ração, água e crescimento, sobretudo porque as DC têm pouca palatabilidade e podem induzir efeitos adversos que poderiam comprometer o estado nutricional dos animais, tais como baixa ingestão de ração, diarreia e constipação, devido ao baixo conteúdo de fibras (ZUPEC-KANIA e SPELLMAN, 2008). Nesse sentido, todas as rações atenderam às recomendações da AIN-93 para micronutrientes, além de terem sido adicionados módulos de fibras às DC. As DCC e DCM também foram introduzidas de modo gradual (1:1, 3:1 e 4:1) como estratégia de adaptação ao novo padrão de ração. O resultado final dos parâmetros nutricionais mostrou ganho de peso e comprimento adequados e semelhante entre os três grupos. Portanto, a subnutrição também não explicou as diferenças no comportamento dos animais. O menor consumo médio em gramas de ração nos grupos DCC e DCM era esperado, já que o conteúdo calórico das DC é superior. Isso se refletiu diretamente no CEA, que foi maior nesses grupos em relação ao DP. Por outro lado, houve um maior consumo calórico médio dos animais das dietas DCC e DCM em relação ao grupo DP. Ainda assim, esse consumo não foi suficiente para promover diferenças no ganho de peso, nem no crescimento dos animais entre os grupos. Fato confirmado pelo CGPCC que relaciona o ganho de peso à

quantidade de calorias consumida. O consumo médio de água, entretanto, foi menor nos grupos DCC e DCM.

Dietas cetogênicas mostram efeitos negativos ao nível sistêmico, induzindo dislipidemias, inflamação e oxidação (GOLDBERG et al, 2021). Paradoxalmente, em relação à inflamação, sabe-se que o BHB é capaz de inibir o NLRP3 inflamassoma, responsável pela ativação da caspase-1 e pela liberação de citocinas como a IL-1 β e a IL-18 (KOH et al, 2020). No presente estudo, observamos uma menor concentração de citocinas no LF em ambas as DCC e DCM. Entretanto, no HC, houve diferença para os dois tratamentos na concentração da IL-6 em relação ao grupo DP, mas a IL-1 β apresentou diferença apenas no grupo DCM em relação ao grupo DP. Reforçando esse perfil, o grupo DCM também apresentou mais incorporação de DHA no HC em relação aos outros dois grupos. É provável que o maior potencial anti-inflamatório da DCM possa estar associado à maior incorporação de DHA, uma vez que os docosanoides derivados desse ácido graxo têm um potencial menos inflamatório (KOH et al, 2020). Apesar dessa possibilidade a NPD não apresentou diferença entre os grupos. Além disso, um estudo prévio, *in vitro*, mostrou que o ácido palmítico poderia induzir complicações na morfologia e na saúde neuronal e que esses efeitos poderiam ser prevenidos pelo DHA (LOEHFELM et al, 2019).

Inflamação e estresse oxidativo estão intimamente relacionados e, portanto, decidimos investigar alguns marcadores oxidativos potencialmente moduláveis pelas DCC e DCM e com possível impacto no comportamento. Um estudo recente encontrou diminuição da concentração de SOD (ARSYAD et al, 2020) nos animais que receberam DC com 86,19% de gorduras, cuja fonte principal foi a gordura de cabra (70%), complementada pelas gorduras da gema de ovo (19,45%), abacate (5,69%) e amendoim torrado (4,86%). Além disso, os animais tiveram maior teor de MDA, avaliado como marcador de peroxidação lipídica no fígado e nos rins. De modo contrário, alguns estudos têm mostrado que, ao nível cerebral, a DC modula a neuroinflamação por meio da ativação do regulador master Nrf2 (MILDER e PATEL, 2012). No presente estudo, não houve diferença na SOD entre os grupos. Entretanto, a enzima antioxidante, catalase no HC do grupo DCM foi menor em relação ao grupo DP, reforçando o possível papel antioxidante das DC.

Considerando que o estresse oxidativo reflete o balanço entre o sistema antioxidante e os produtos de oxidação, o presente estudo também avaliou os danos oxidativos ao DNA e a LDLox. Embora a 8-OHdG tenha sido semelhante entre os grupos,

observamos que os grupos DCC e DCM apresentaram menores concentrações de LDLox no LF e no HC, confirmando um efeito antioxidante das DC, independente do perfil de ácidos graxos. Sabe-se que as dislipidemias e, particularmente, o aumento da LDL-c fazem parte do conjunto de reações adversas sistêmicas à terapia com DC (GOLDBERG et al, 2021, CROSIER e McPHERSON, 2022). Portanto, seria plausível que a concentração de LDLox) inclusive nos tecidos cerebrais, estivesse aumentada. Entretanto, esta hipótese não se confirmou no estudo atual. Uma justificativa desse efeito poderia estar associada à elevada concentração de corpos cetônicos e, especialmente, o BHB, devido a sua estabilidade e capacidade de translocar a barreira hemato-encefálica (JENSEN et al, 2020). Recentemente, MAJRASHI e colaboradores (2021) mostraram que a adição de BHB à cultura de neurônios hipocámpais HT22, foi capaz de inibir a produção de ROS e aumentar a atividade das enzimas antioxidantes GPX e catalase. Ambas as dietas, DCC e DCM, tiveram a concentração de BHB no plasma dos animais aumentada em cerca de 2 vezes quando comparados ao grupo DP.

Embora tenhamos encontrado um discreto melhor efeito anti-inflamatório no HC a favor da DCM, a redução da catalase no HC desse mesmo grupo e da LDLox nos dois grupos DC, além de apresentarem certa contradição, são incapazes de sustentar uma relação de causalidade com o pior desempenho dos animais nos testes comportamentais.

Quando ampliamos nosso foco para a atividade metabólica cerebral monitorada por meio da captação de FDG-18, verificamos que ambos os grupos DCC e DCM apresentaram maior atividade cerebral que o grupo DP. De modo semelhante, o estudo de ROY e colaboradores (2012) descreveu aumento de captação de glicose e de acetoacetato em ratos mais velhos, resultado que os autores sugeriram estarem ligados a benefícios da DC 3,5:1 em modelo experimental de Doença de Alzheimer e na diabetes. Outro estudo do mesmo grupo já havia chegado a resultados muito semelhantes com aumento da captação de C-acetotacetato-11 (C-AcAc-11) e de FDG-18F após o consumo agudo (2 dias) de DC 3,5:1 (PIFFERI et al, 2011). O FDG-18F tem sido amplamente usado em estudos envolvendo o cérebro, pois mantém relação direta com a integridade e a atividade metabólica dos compartimentos cerebrais. A redução da captação de 18F-FDG em determinados compartimentos cerebrais se correlaciona estreitamente com o desempenho cognitivo e pode ser usada como parte do procedimento de diagnóstico de diferentes tipos de doenças demenciais como a DA e a demência frontotemporal (DFT) (MINOSHIMA et al, 2021). Nossos resultados confirmam que as DCC e DCM não causaram danos à

estrutura cerebral associada à menor captação de FDG-18F, levando ao comprometimento das habilidades comportamentais.

O presente estudo apresenta limitações que devem ser consideradas na análise dos seus resultados. Certamente o tamanho amostral é a maior limitação do estudo, pois, embora a literatura sustente o uso de 5-6 animais por grupo experimental, nós tivemos a perda de 2 animais ao longo do experimento. Apesar de termos adotado uma estratégia estatística de imputação de dados, entendemos que esta ferramenta não é capaz de expressar a resposta individual dos animais que não chegaram até o final do estudo. Outra limitação importante a ser considerada se refere à suplementação das DCC e DCM com o dobro das vitaminas recomendadas pela AIN-93, tanto para compensar o menor consumo em gramas dessas rações, quanto para prevenir perdas durante a produção das rações. Entretanto, não houve suplementação no grupo DP. Embora essas diferenças possam ter aumentado o potencial antioxidante e anti-inflamatório das DCC e DCM quando comparadas à DP, foi possível identificar diferenças inerentes à composição de ácidos graxos presentes nas DC. O uso de diferentes padrões de DC, o monitoramento comportamental, a análise de diversos marcadores bioquímicos, segundo compartimentos cerebrais e a avaliação da atividade cerebral por meio do PET-CT tornam o presente estudo inédito e promissor a futuras investigações.

9. CONCLUSÃO

Nosso estudo buscou entender se a modificação da DCC, geralmente mais rica em gorduras saturadas, alterando sua composição para proporcionar uma dieta mais rica em ácidos graxos mono e poli-insaturados, inclusive o DHA, poderia assumir um papel menos inflamatório e oxidativo, e levar a um menor prejuízo cognitivo e comportamental. Nossos resultados indicaram comportamento mais ansioso nos animais que consumiram a DCC. Entretanto, não foi possível explicar essa diferença pelas vias inflamatória e antioxidante estudadas.

10. CONFLITO DE INTERESSES

Não há conflito de interesses nesse trabalho.

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-WAHAB, B. A.; SHAIKH, I. A.; KHATEEB, M. M.; HABEEB, S. M. Omega 3 polyunsaturated fatty acids enhance the protective effect of levetiracetam against seizures, cognitive impairment and hippocampal oxidative DNA damage in young kindled rats. *Pharmacol Biochem Behav*, n. 135, p. 105-113, 2015.

ABESO. Posicionamento sobre o tratamento nutricional do sobrepeso e da obesidade: departamento de nutrição da Associação Brasileira para o estudo da obesidade e da síndrome metabólica. / Coordenação Renata Bressane Pepe, Clarissa Tamie Hiwatashi Fujiwara, Mônica Beyruti. — 1. ed. — São Paulo, 2022. ISBN 978-85-93044-01-4

APA (American Psychiatric Association). Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais: DSM-5. Tradução: Maria Inês Corrêa Nascimento et al.; revisão técnica: Aristides Volpato Cordioli et al. 5ª Ed, Artmed, Porto Alegre, 2014.

AQUINO, C. C. Efeito das dietas hipoproteica e hiperlipídica em marcadores de estresse oxidativo, inflamação e permeabilidade da barreira hematoencefálica no hipocampo e comportamento de ansiedade. 2019. 113 f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2019.

ARSYAD, A.; IDRIS, I.; RASYID, A. A.; USMAN, R. A.; FARADILLAH, K. R.; LATIF, W. O. U.; LUBIS, Z. I.; AMINUDDIN, A.; YUSTISIA, I.; DJABIR, Y. Y. Long-Term Ketogenic Diet Induces Metabolic Acidosis, Anemia, and Oxidative Stress in Healthy Wistar Rats. *J Nutr Metab*, v. 19, n. 3642035, 2020. doi: 10.1155/2020/3642035. PMID: 32685205; PMCID: PMC7341377.

BARBORKA, C. J. Epilepsy in adults: results of treatment by ketogenic diet in one hundred cases. *Arch Neur Psych*, v. 23 n. 5 p. 904-914, 1930.

BAZAN, N. G. Neuroprotectin D1 (NPD1): a DHA-derived mediator that protects brain and retina against cell injury-induced oxidative stress. *Brain Pathol*, v. 15, n. 2, p. 159-66, 2005. doi: 10.1111/j.1750-3639.2005.tb00513.x. PMID: 15912889; PMCID: PMC8095981.

BENNETT, O. A.; RAMSAY, S. C.; MALACOVA, E.; BOURGEAT, P.; GOODMAN, S. J.; DUNN, C.J.; ROBINSON, B. M.; LEE, K.; PATTISON, D. A. Regional differences in the reduction in cerebral FDG uptake induced by the ketogenic diet. *Eur J Hybrid Imaging*, V. 6, N. 29, 2022. doi: 10.1186/s41824-022-00150-5. PMID: 36517647; PMCID: PMC9751237.

BLACK, M. M. Impact of Nutrition on Growth, Brain, and Cognition. *Nestle Nutr Inst Workshop Ser*, N. 89, P. 185-195, 2018. doi: 10.1159/000486502. Epub 2018 Jul 10. PMID: 29991042.

CALDER, P. C. The Relationship between the fatty acid composition of immune cells and their function. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, v. 79, p. 101–108, 2008.

CALDER, P. C. The Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: effects, mechanisms and clinical relevance. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1851, p. 469–484, 2015.

COHEN, H.; MATAR, M. A.; JOSEPH, Z. Animal models of post-traumatic stress disorder. *Curr Protoc Neurosci*, Unit 9.45.1, Sup. 64, 2013.

COHEN, K. de O.; JACKIX, M. de N. H. Características químicas e física da gordura de cupuaçu e da manteiga de cacau. Embrapa Cerrados, Planaltina, 2009, 22 p. (Documentos / Embrapa Cerrados, ISSN 1517-5111, ISSN online 2176-5081; 269).

CROSIER, R.; McPHERSON, R. Profound Elevation in LDL Cholesterol Level Following a Ketogenic Diet: A Case Series. *CJC Open*, v. 4, n. 8, p. 732-734, 2022. doi: 10.1016/j.cjco.2022.05.001. PMID: 36035741; PMCID: PMC9402960.

CURZON, P.; RUSTAY, N. R.; BROWMAN, K. E. Cued and Contextual Fear Conditioning for Rodents. In: Buccafusco JJ, editor. *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*. 2nd ed. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2009. Chapter 2. PMID: 21204331.

DE BRUIN, N.M.; PRICKAERTS J.; VAN LOEVEZIJN, A.; VENHORST, J.; DE GROOTE, L.; HOUBA, P.; RENEERKENS, O.; AKKERMAN, S.; KRUSE, C. G. Two novel 5-HT₆ receptor antagonists ameliorate scopolamine-induced memory deficits in the object recognition and object location tasks in Wistar rats. *Neurobiol Learn and Mem*, v. 96, n. 2, p. 392-402, 2011.

DIETCH, D. M.; KERR-GAFFNEY, J.; HOCKEY, M.; MARX, W.; RUUSUNEN, A.; YOUNG, A. H.; BERK, M.; MONDELLI, V. Efficacy of low carbohydrate and ketogenic diets in treating mood and anxiety disorders: systematic review and implications for clinical practice. *BJPsych Open*, v. 9, n. e70, 2023. doi: 10.1192/bjo.2023.36. PMID: 37066662; PMCID: PMC10134254.

DYALL, SC. Long-chain omega-3 fatty acids and the brain: a review of the independent and shared effects of EPA, DPA and DHA. *Front Aging Neurosci*, v. 7, n. 52, 2015.

ENNACEUR A.; DELACOUR J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behavioral Brain Research*, n. 31, p. 47-59, 1988.

FERNANDES, J.; SOARES, J. C.; BALIEGO, L. G. Z. do A.; ARIDA, R. M. A single bout of resistance exercise improves memory consolidation and increases the expression of synaptic proteins in the hippocampus. *Hippocampus*, v. 26, n. 8, p 1096-1103, 2016.

FUKUSHIMA, A.; OGURA, Y.; FURUTA, M.; KAKEHASHI, C.; FUNABASHI, T.; AKEMA, T. Ketogenic diet does not impair spatial ability controlled by the hippocampus in male rats. *Brain Res*, n. 1622, p. 36-42, 2015. doi: 10.1016/j.brainres.2015.06.016. Epub 2015 Jun 23. PMID: 26111645.

GARDNER, C. D.; LANDRY, M. J.; PERELMAN, D.; PETLURA, C.; DURAND, L. R.; ARONICA, L.; CRIMARCO, A.; CUNANAN, K. M.; CHANG, A.; DANT, C. C.; ROBINSON, J. L.; KIM, S. H. Effect of a ketogenic diet versus Mediterranean diet on

glycated hemoglobin in individuals with prediabetes and type 2 diabetes mellitus: The interventional Keto-Med randomized crossover trial. *Am J Clin Nutr*, v. 116 n. 3 p 640-652, 2022. doi: 10.1093/ajcn/nqac154. Errata em: *Am J Clin Nutr*, v. 116, n. 6, p. 1904, 2022 Dec 19;. PMID: 35641199; PMCID: PMC9437985.

GIANFRANCESCO, M. A.; DEHAIRS, J.; L'HOMME L.; HERINCKX, G.; ESSER, N.; JANSEN, O.; HABRAKEN, Y.; LASSENCE, C.; SWINNEN, J. V.; RIDER, M. H.; PIETTE, J.; PAQUOT, N.; LEGRAND-POELS, S. Saturated fatty acids induce NLRP3 activation in human macrophages through K⁺ efflux resulting from phospholipid saturation and Na, K-ATPase disruption. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, v. 1864 n. 7 p. 1017-1030, 2019. doi: 10.1016/j.bbalip.2019.04.001. PMID: 30953761.

GOLDBERG, I. J.; IBRAHIM, N.; BREDEFELD, C.; FOO, S.; LIM, V.; GUTMAN, D.; HUGGINS, L. A.; HEGELE, R.A. Ketogenic diets, not for everyone. *J Clin Lipido*, v. 15, n. 1, p. 61-67, 2021. doi: 10.1016/j.jacl.2020.10.005. Epub 2020 Oct 31. PMID: 33191194; PMCID: PMC7887024.

GRIGOLON, R. B.; GERCHMAN, F.; SCHÖFFEL, A. C.; HAWKEN, E. R.; GILL, H.; VAZQUEZ, G. H.; MANSUR, R. B.; MCINTYRE, R. S.; BRIETZKE, E. Mental, emotional, and behavioral effects of ketogenic diet for non-epileptic neuropsychiatric conditions. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, v. 102, n. 109947, 2020. doi: 10.1016/j.pnpbp.2020.109947. PMID: 32305355.

GUPTA, S.; KNIGHT, A. G.; GUPTA, S.; KELLER, J. N.; BRUCE-KELLER, A. J. Saturated long-chain fatty acids activate inflammatory signaling in astrocytes. *J Neurochem*, n. 120, p. 1060-1071, 2012.

HAJJAR, T.; MENG, G. Y.; RAJION, M. A.; VIDYADARAN, S.; OTHMAN, F.; FARJAM, A. S.; LI, T. A.; EBRAHIMI, M. Omega 3 polyunsaturated fatty acid improves spatial learning and hippocampal peroxisome proliferator activated receptors (PPAR α and PPAR γ) gene expression in rats. *BMC Neurosci*, v. 13, n. 109, 2012. doi: 10.1186/1471-2202-13-109. PMID: 22989138; PMCID: PMC3465241.

HALLBÖÖK, T.; JI, S.; MAUDSLEY, S.; MARTIN, B. The effects of the ketogenic diet on behavior and cognition. *Epilepsy Res*, v. 100, n. 3, p. 304-9, 2012. doi: 10.1016/j.epilepsyres.2011.04.017. Epub 2011 Aug 27. PMID: 21872440; PMCID: PMC4112040.

HAN, S. N.; LEKA, L. S.; LICHTENSTEIN A. H.; AUSMAN, L. M.; SCHAFER E. J.; MEYDANI, S. N. Effect of hydrogenated and saturated, relative to polyunsaturated, fat on immune and inflammatory responses of adults with moderate hypercholesterolemia. *J Lipid Res*, v. 43, n. 3, p. 445-452, 2002. ISSN 0022-2275, [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)30151-6](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)30151-6).

HÖHN, S.; DOZIÈRES-PUYRAVEL, B.; AUVIN, S. History of dietary treatment from Wilder's hypothesis to the first open studies in the 1920s. *Epilepsy Behav*. V. 101 (Pt A), n. 106588, 2019. doi: 10.1016/j.yebeh.2019.106588. Epub 2019 Oct 30. PMID: 31677579.

HUANG, J.; LI, Y-Q.; WU, C-H.; ZHANG, S-T.; CHEN, Y-J.; DENG, Y-H.; XUAN, A.; SUN, X-D. The effect of ketogenic diet on behaviors and synaptic functions of naive mice. *Brain Behav*, v. 9, n. e01246, 2019. <https://doi.org/10.1002/brb3.1246>

HUTTENLOCHER, P. R.; WILBOURN, A. J.; SIGNORE, J. M. Medium-chain triglycerides as a therapy for intractable childhood epilepsy. *Neurology*, v. 21, 1971.

IGHODARO, O. M.; AKINLOYE, O. A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria J Med*, n. 54, p. 287-293, 2018.

IJFF, D. M.; POSTULART, D.; LAMBRECHTS, D. A. J. E.; MAJOIE, M. H. J. M.; DE KINDEREN, R. J. A.; HENDRIKSEN, J. G. M.; EVERS, S. M. A. A.; ALDENKAMP, A. P. Cognitive and behavioral impact of the ketogenic diet in children and adolescents with refractory epilepsy: A randomized controlled trial. *Epilepsy Behav*, n. 60, p. 153-157, 2016. doi: 10.1016/j.yebeh.2016.04.033. Epub 2016 May 18. PMID: 27206235.

ISLAM, A.; AMIN, M. N.; SHAFAYET, A. S.; HOSSAIN P.; SULTANA, F.; KABIR, R. Trans fatty acids and lipid profile: A serious risk factor to cardiovascular disease, cancer and diabetes, *Diabetes & Metabolic Syndrome. Clin Res Rev*, v. 13, n. 2 p. 1643-1647, 2019. ISSN 1871-4021, <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2019.03.033>.

JENSEN, N. J.; WODSCHOW, H. Z.; NILSSON, M.; RUNGBY, J. Effects of Ketone Bodies on Brain Metabolism and Function in Neurodegenerative Diseases. *Int J Mol Sci* v. 21, n. 8767, 2020. doi: 10.3390/ijms21228767. PMID: 33233502; PMCID: PMC7699472.

KOH, S.; DUPUIS, N.; AUVIN, S. Ketogenic diet and Neuroinflammation. *Epilepsy Res*, v. 167, n. 106454, 2020. doi: 10.1016/j.eplepsyres.2020.106454. Epub 2020 Sep 6. PMID: 32987244.

KOSSOFF, E. H.; HARTMAN, A. L. Ketogenic diets: new advances for metabolism-based therapies. *Curr Opin Neurol*, v. 25, n. 2, p. 173–178, 2012. Doi: 10.1097/WCO.0b013e3283515e4a

KWITEROVICH, P. O.; VINING, E. P.; PYZIK, P.; SKOLASKY, R.; FREEMAN, J. M. Effect of a high-fat ketogenic diet on plasma levels of lipids, lipoproteins, and apolipoproteins in children. *JAMA*, v. 290, n. 7, p. 912-920, 2003.

LANGE, K. W.; LANGE, K. M.; MAKULSKA-GERTRUDA, E.; NAKAMURA, Y.; REISSMANN, A.; KANAYA, S.; HAUSER, J. Ketogenic diets and Alzheimer's disease, *Food Sci and Hum Wellness*, v. 6, n. 1, p. 1-9, 2017. ISSN 2213-4530, <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2016.10.003>.

LEE, P. R.; KOSSOFF, E. H. Dietary treatments for epilepsy: management guidelines for the general practitioner. *Epilepsy Behav*, v. 21, n. 2, p. 115-21, 2011. doi: 10.1016/j.yebeh.2011.03.008. Epub 2011 Apr 21. PMID: 21514240.

LEZAK, K. R.; MISSIG, G.; CARLEZON, W. A. Jr. Behavioral methods to study anxiety in rodents. *Dialogues Clin Neurosci*, v. 19, n. 2, p. 181-191, 2017. doi: 10.31887/DCNS.2017.19.2/wcarlezon. PMID: 28867942; PMCID: PMC5573562.

LIMA, P. A.; SAMPAIO, L. P.; DAMASCENO, N. R. Neurobiochemical mechanisms of a ketogenic diet in refractory epilepsy. *Clinics*, v. 69, n. 10, p. 699-705. doi: 10.6061/clinics/2014(10)09. PMID: 25518023; PMCID: PMC4221309.

LIMA, P. A. de; PRUDÊNCIO, M. B.; MURAKAMI, D. K.; SAMPAIO, L. P. de B.; FIGUEIREDO NETO, A. M.; DAMASCENO, N. R. T. Effect of classic ketogenic diet treatment on lipoprotein subfractions in children and adolescents with refractory epilepsy. *Nutrition*, v. 33, p. 271-277, 2017.

LING, Y.; WANG, D. D.; SUN, Y. X.; ZHAO, D. J.; NI, H. Neuro-Behavioral Status and the Hippocampal Expression of Metabolic Associated Genes in Wild-Type Rat Following a Ketogenic Diet. *Front Neurol*, v. 10, n. 65, 2019. doi: 10.3389/fneur.2019.00065. PMID: 30804881; PMCID: PMC6370680.

LOEHFELM, A.; ELDER, M. K.; BOUCSEIN, A.; JONES, P. P.; WILLIAMS, J. M.; TUPS, A. Docosahexaenoic acid prevents palmitate-induced insulin-dependent impairments of neuronal health. *The FASEB Journal*, n. 34, p. 4635–4652, 2020. <https://doi.org/10.1096/fj.201902517R>

MAJRASHI, M.; ALTUKRI, M.; RAMESH, S.; GOVINDARAJULU, M.; SCHWARTZ, J.; ALMAGHRABI, M.; SMITH, F.; THOMAS, T.; SUPPIRAMANIAM, V.; MOORE, T.; REED, M.; DHANASEKARAN, M. β -hydroxybutyric acid attenuates oxidative stress and improves markers of mitochondrial function in the HT-22 hippocampal cell line. *J Integr Neurosci*, v. 20, n. 2 p. 321–329, 2021. <https://doi.org/10.31083/j.jin2002031>

MARIE, A. La lutte contre l'épilepsie par la reeducation alimentaire. *Epilepsia*, v. A2, n. 3, p 256-273, 1911.

MARTIN, K; JACKSON, C. F; LEVY, R. G; COOPER, P. N. Ketogenic diet and other dietary treatments for epilepsy (Review). *Cochrane Database Syst Rev*, n. 2, 2016.

MATÉS, J. M.; PÉREZ-GÓMEZ, C.; NÚÑEZ DE CASTRO, I. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem*, v. 32, n. 8, p. 595-603, 1999. doi: 10.1016/s0009-9120(99)00075-2. PMID: 10638941.

MELLO-CARPES P. B.; IZQUIERDO I. The nucleus of the solitary tract → Nucleus Paragigantocellularis → Locus Coeruleus → CA1 region of dorsal hippocampus pathway is important for consolidation of object recognition memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, n. 100, p. 56-63, 2013.

MERRITT, H. H.; PUTNAM, T. J. Sodium diphenyl hydantoin in the treatment of convulsive disorders. *JAMA*, n. 111 p. 1068-73, 1938.

MILANSKI, M.; DEGASPERI, G.; COOPE, A.; MORARI, J.; DENIS, R.; CINTRA, D.

E.; TSUKUMO, D. M. L.; ANHE, G.; AMARAL, M. E.; TAKAHASHI, H. K.; CURI, R.; OLIVEIRA, H. C.; CARVALHEIRA, J. B. C.; BORDIN, S.; SAAD, M. J.; VELLOSO, L. A. Saturated fatty acids produce an Inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. *J Neurosci*, v. 29, n. 2, p. 359–370, 2009.

MILDER, J.; PATEL, M. Modulation of oxidative stress and mitochondrial function by the ketogenic diet. *Epilepsy Res*, v. 100, n. 3, p. 295-303, 2012. doi: 10.1016/j.eplepsyres.2011.09.021. Epub 2011 Nov 9. PMID: 22078747; PMCID: PMC3322307.

MINOSHIMA, S.; MOSCI, K.; CROSS, D.; THIENYUNYAKIT, T. Brain [F-18]FDG PET for Clinical Dementia Workup: Differential Diagnosis of Alzheimer's Disease and Other Types of Dementing Disorders. *Semin Nucl Med*, v. 51, n. 3, p. 230-240, 2021. doi: 10.1053/j.semnuclmed.2021.01.002. Epub 2021 Feb 2. PMID: 33546814.

MOREIRA, J. D.; SIQUEIRA, L. V.; MÜLLER, A. P.; PORCIÚNCULA, L. O.; VINADÉ, L.; SOUZA, D. O. Dietary omega-3 fatty acids prevent neonatal seizure-induced early alterations in the hippocampal glutamatergic system and memory deficits in adulthood. *Nutr Neurosci*, v. 25, n. 5, p. 1066-1077, 2022. DOI: 10.1080/1028415X.2020.1837569

MUNDI, M. S.; ELFADIL, O. M.; PATEL, I.; PATEL, J.; HURT, R. T. Ketogenic diet and cancer: Fad or fabulous? *J Parenter Enteral Nutr*, n. 45, p S26–S32, 2021. <https://doi.org/10.1002/jpen.2226>

MURUGAN, M.; BOISON D. Ketogenic diet, neuroprotection, and antiepileptogenesis. *Epilepsy Res*, v.167 n. 106444. P 1-8, 2020. doi: 10.1016/j.eplepsyres.2020.106444. Epub. PMID: 32854046; PMCID: PMC7655615.

MUSCOGIURI, G.; EL GHOCH, M.; COLAO, A.; HASSAPIDOU, M., YUMUK, V.; BUSETTO, L. Obesity Management Task Force (OMTF) of the European Association for the Study of Obesity (EASO). European Guidelines for Obesity Management in Adults with a Very Low-Calorie Ketogenic Diet: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Obes Facts*, v. 14, n. 2 p. 222-245, 2021. doi: 10.1159/000515381. Epub 2021 Apr 21. PMID: 33882506; PMCID: PMC8138199.

NAKAJIMA, S.; FUKASAWA, K.; GOTOH, M. et al. Saturated fatty acid is a principal cause of anxiety-like behavior in diet-induced obese rats in relation to serum lysophosphatidyl choline level. *Int J Obes*, v. 44, p. 727–738, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41366-019-0468-z>

NAKAMURA, K.; TONOUCHE, H.; SASAYAMA, A.; ASHIDA, K. A Ketogenic Formula Prevents Tumor Progression and Cancer Cachexia by Attenuating Systemic Inflammation in Colon 26 Tumor-Bearing Mice. *Nutrients*, v. 10 n. 206, 2018. doi: 10.3390/nu10020206. PMID: 29443873; PMCID: PMC5852782.

NEAL, E. G.; CHAFFE, H.; SCHWARTZ, R. H.; LAWSON, M. S.; EDWARDS, N.; FITZSIMMONS, G.; WHITNEY, A.; CROSS, J. H. A randomized trial of classical and

medium-chain triglyceride ketogenic diets in the treatment of childhood epilepsy. *Epilepsia*, v. 50, n. 5, p 1109-1117, 2009.

NIZAMUDDIN, J.; TURNER, Z.; RUBENSTEIN, J. E.; PYZIC, P. L.; KOSSOFF, E. H. Management and risk factors for dyslipidemia with the ketogenic diet. *J Child Neurol*, v. 23, n. 7, p. 758-761, 2008.

OKAMURA, T.; HASHIMOTO, Y.; MAJIMA, S.; SENMARU, T.; USHIGOME, E.; NAKANISHI, N.; ASANO, M.; YAMAZAKI, M.; TAKAKUWA, H.; HAMAGUCHI, M.; FUKUI, M. Trans Fatty Acid Intake Induces Intestinal Inflammation and Impaired Glucose Tolerance. *Front Immunol.* v. 29, n. 669672, 2021. doi: 10.3389/fimmu.2021.669672.

ORTÍ, J. E. R.; CUERDA-BALLESTER, M.; SANCHIS-SANCHIS, C. E.; LAJARA ROMANCE, J.M.; NAVARRO-ILLANA, E.; GARCÍA PARDO, M. P. Exploring the impact of ketogenic diet on multiple sclerosis: obesity, anxiety, depression, and the glutamate system. *Front Nutr*, v. 10, n. 1227431, 2023. doi: 10.3389/fnut.2023.1227431. PMID: 37693246; PMCID: PMC10485376.

PALL, M. L.; LEVINE, S. Nrf2, a master regulator of detoxification and also antioxidant, anti-inflammatory and other cytoprotective mechanisms, is raised by health promoting factors. *Acta Physiologica Sinica*, v. 67, n. 1 p. 1–18, 2015.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S.E.; BRILEY, M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods*, n. 14, p 149-167, 1985.

PERUCCA, E.; BIALER, M.; WHITE, H. S. New GABA-Targeting Therapies for the Treatment of Seizures and Epilepsy: I. Role of GABA as a Modulator of Seizure Activity and Recently Approved Medications Acting on the GABA System. *CNS Drugs*, v. 37, n. 9, p. 755-779, 2023. doi: 10.1007/s40263-023-01027-2. Epub 2023 Aug 21. PMID: 37603262; PMCID: PMC10501955.

PETERMAN, M. G. The Ketogenic diet in the treatment of epilepsy: a preliminary report. *Am J Dis Child*, n. 28 p. 28-33, 1294.

PIFFERI, F.; TREMBLAY, S.; CROTEAU E.; FORTIER M.; TREMBLAY-MERCIER, J.; LECOMTE, R.; CUNNANE S. C. Mild experimental ketosis increases brain uptake of 11C-acetoacetate and 18F-fluorodeoxyglucose: a dual-tracer PET imaging study in rats. *Nutr Neurosci*, v. 14 n. 2, p. 51-58, 2011. DOI: 10.1179/1476830510Y.0000000001

PIMENTEL, G. D.; LIRA, F. S.; ROSA, J. C.; NASCIMENTO, C. M. O.; OYAMA, L. M.; WATANABE, R. L. H.; RIBEIRO, E. B. High-fat fish oil diet prevents hypothalamic inflammatory profile in rats. *ISRN Inflamm*, v. 28 n. 419823, 2013. doi: 10.1155/2013/419823. PMID: 24049658; PMCID: PMC3767199.

PISTELL, P. J.; MORRISON, C. D.; GUPTA, S.; KNIGHT, A. G.; KELLER, J. N.; INGRAM, D. K.; BRUCE-KELLER, A. J. Cognitive impairment following high fat diet consumption is associated with brain inflammation. *J Neuroimmunol*, v. 219 n. 1-2, p. 25-32, 2010. doi: 10.1016/j.jneuroim.2009.11.010. Epub 2009 Dec 8. PMID: 20004026; PMCID: PMC2823983.

PRUDENCIO, M. B. Impacto dos ácidos graxos dietéticos no perfil lipídico, inflamatório, oxidativo e na ativação de fatores de transcrição NF-kB e Nrf2 em pacientes com epilepsia submetidos à dieta cetogênica. Mestrado. Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

PUTTACHARY, S.; SHARMA, S.; STARK, S.; THIPPESWAMY, T. Seizure-induced oxidative stress in temporal lobe epilepsy. *Biomed Res Int*, n. 745613, 2015. doi: 10.1155/2015/745613. Epub 2015 Jan 20. PMID: 25650148; PMCID: PMC4306378.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. Jr. AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr*, n 123, p 1939-51, 1993.

REZAEI, S.; HARSINI, S.; KAVOOSI, M.; BADV, R. S.; MAHMOUDI, M. Efficacy of low glycemic index treatment in epileptic patients: a systematic review. *Acta Neurol Belg*, n. 118, p 339–349 (2018). <https://doi.org/10.1007/s13760-018-0881-4>

RODENAS-GONZALES, F.; BLANCO-GANDIA, M. C.; MIÑARRO, J.; RODRIGUEZ-ARIAS, M. Cognitive profile of male mice exposed to a Ketogenic Diet. *Physiol Behav*, v. 254 n. 113883, p 1-9, 2022. doi: 10.1016/j.physbeh.2022.113883. Epub 2022 Jun 15. PMID: 35716801.

ROGAWSKI, M. A.; LÖSCHER, W. The Neurobiology of antiepileptic drugs for the treatment of nonepileptic conditions. *Nat Med*, v. 10, n. 7, 2004.

ROGAWSKI, M. A.; LÖSCHER, W.; RHO, J. M. Mechanisms of action of antiseizure drugs and the ketogenic diet. *Cold Spring Harb Perspect Med*, n. 6, v. 5, 2016.

ROY, M.; NUGENT, S.; TREMBLAY-MERCIER, J.; TREMBLAY, S.; COURCHESNE-LOYER, A.; BEAUDOIN, J. F.; TREMBLAY, L.; DESCOTEAUX, M.; LECOMTE, R.; CUNNANE, S. C. The ketogenic diet increases brain glucose and ketone uptake in aged rats: a dual tracer PET and volumetric MRI study. *Brain Res*, v. 7, n. 1488 p. 14-23, 2012. doi: 10.1016/j.brainres.2012.10.008. Epub 2012 Oct 9. PMID: 23063891.

SCHWARTZ, R. H.; EATNO, J.; BOWER, B. D.; AYNSLEY-GREEN, A. Ketogenic diets in the treatment of epilepsy: short-term clinical effects. *Dev Med Child Neurol*, v. 31, p. 145-151, 1989.

SIES, H.; STAHL, W. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. *Am J Clin Nutr*, v. 62, sup. 6, p. 1315S-1321S, 1995. doi: 10.1093/ajcn/62.6.1315S. PMID: 7495226.

SILVA-SANTI, L. G. da; ANTUNES, M. M.; MORI, M. A.; ALMEIDA-SOUZA, C. B de; VISENTAINER, J. V.; CARBONERA, F.; CRISMA A. R.; MASI, L. N.; HIRABARA, S. M.; CURI, R.; BAZOTTE, R. B. Brain fatty acid composition and inflammation in mice fed with high-carbohydrate diet or high-fat diet. *Nutrients*, v. 10, n. 1277, 2018. doi: 10.3390/nu10091277.

STAFSTROM, C. E.; RHO, J. M. Epilepsy and the ketogenic diet. Totowa, Humana Press, 2004. ISBN 978-1-59259-808-3 (eBook) DOI 10.1007/978-1-59259-808-3

SUSSMAN, D.; GERMANN, J.; HENKELMAN, M. Gestational ketogenic diet programs brain structure and susceptibility to depression & anxiety in the adult mouse offspring. *Brain Behav*, v. 5, n. e00300, 2015. doi: 10.1002/brb3.300. Epub 2014 Dec 29. PMID: 25642385; PMCID: PMC4309881.

TAHA, A. Y.; BURNHAM, W. M.; AUVIN, S. Polyunsaturated fatty acids and epilepsy. *Epilepsia*, v. 51, n. 8, p. 1348-58, 2010.

VERROTTI, A.; IAPADRE, G.; DI FRANCESCO, L.; ZAGAROLI, L.; FARELLO, G. Diet in the Treatment of Epilepsy: What We Know So Far. *Nutrients*, v. 12 n. 2645, 2020. doi: 10.3390/nu12092645. PMID: 32872661; PMCID: PMC7551815.

VINCIGUERRA, F.; GRAZIANO, M.; HAGNÄS, M.; FRITTITTA, L.; TUMMINIA, A. Influence of the Mediterranean and Ketogenic Diets on Cognitive Status and Decline: A Narrative Review. *Nutrients*, v. 12, n. 1019, 2020. doi: 10.3390/nu12041019. PMID: 32276339; PMCID: PMC7231139.

WALSH, R. N.; CUMMINS, R. A. The open field test: a critical review. *Psychol Bull*, v. 83, p. 482–504, 1976.

WEBER, D. D.; AMINZADEH-GOHARI, S.; TULIPAN, J.; CATALANO, L.; FEICHTINGER, R. G.; KOFLER, B. Ketogenic diet in the treatment of cancer – Where do we stand?, *Molecular Metabolism*, v. 33, p 102-121, 2020. ISSN 2212-8778, <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2019.06.026>.

WŁODARCZYK, A.; CUBAŁA, W. J.; WIELEWICKA, A. Ketogenic Diet: A Dietary Modification as an Anxiolytic Approach? *Nutrients*, v. 12, n. 3822, 2020. doi: 10.3390/nu12123822. PMID: 33327540; PMCID: PMC7765029.

WU, A.; YING, Z.; GOMEZ-PINILLA, F. Docosahexaenoic acid dietary supplementation enhances the effects of exercise on synaptic plasticity and cognition. *Neuroscience*, v. 155, n. 3, p. 751-9, 2008. doi: 10.1016/j.neuroscience.2008.05.061. Epub 2008 Jun 17. PMID: 18620024; PMCID: PMC3208643.

YOUM, Y-H.; NGUYEN, K. Y.; GRANT, R. W.; GOLDBERG, E. L.; BODOGAI, M.; KIM, D.; D'AGOSTINO, D.; PLANAVSKY, N.; LUPFER, C.; KANNEGANTI, T. D.; KANG, S.; HORVATH, T. L.; FAHMY, T. M.; CRAWFORD, P. A.; BIRAGYN, A.; ALNEMRI, E.; DIXIT, V. D. The ketone metabolite β -hydroxybutyrate blocks NLRP3 inflammasome-mediated inflammatory disease. *Nature Medicine*, v. 21, n. 3, p 263-269, 2015. doi:10.1038/nm.3804

YUDKOFF, M.; DAIKHIN, Y.; HORYN, O.; NISSIM, I.; NISSIM, I. Ketosis and Brain Handling of Glutamate, Glutamine and GABA. *Epilepsia*. V. 49, n. s8, p. 73-75, 2008.

ZENG, Y-Q.; HE, J-T.; HU, B-Y.; LI, W.; DENG, J.; LIN, Q-L.; FANG Y. Virgin coconut oil: A comprehensive review of antioxidant activity and mechanisms contributed

by phenolic compounds, *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2022. DOI: 10.1080/10408398.2022.2113361

ZHAO, Q.; STAFSTROM, C. E.; FU, D. D.; HU, Y.; HOLMES, G. L. Detrimental effects of the ketogenic diet on cognitive function in rats. *Pediatric Res*, v. 55, n. 3, p. 498-506, 2004.

ZHU, P.; ZHANG, J. J.; CEN, Y.; YANG, Y.; WANG, F.; GU, K.P.; YANG, H. T.; WANG, Y. Z.; ZOU, Z. Q. High Endogenously Synthesized N-3 Polyunsaturated Fatty Acids in Fat-1 Mice Attenuate High-Fat Diet-Induced Insulin Resistance by Inhibiting NLRP3 Inflammasome Activation via Akt/GSK-3 β /TXNIP Pathway. *Molecules*, v. 27, n. 6384. doi: 10.3390/molecules27196384. PMID: 36234919; PMCID: PMC9570616.

ZUPEC-KANIA, B. A.; SPELLMAN, E. An Overview of the Ketogenic Diet for Pediatric Epilepsy. *Nutr Clin Pract*, v. 23, n. 6, p. 589-596, 2008. Doi: 10.1177/0884533608326138

APÊNDICES

Apêndice 1. Protocolos de coleta de dados.

Protocolo 1- Identificação dos animais

ITENS NECESSÁRIOS: formulário padrão, caneta permanente, luva para manipular animal.

No dia 1 do experimento (**T0**), logo após o recebimento dos animais:

1. Identificar cada animal utilizando caneta permanente;
2. Marque a cauda do animal com 1-2-3-4-5-6, linhas fortes contínuas a depender do número de animais;
3. No formulário de identificação registre cada animal ao seu ID (numérico) de com o grupo de intervenção:

2 primeiros dígitos – Grupo

2 últimos dígitos – ID animal

0101 – Grupo Controle e recebendo dieta ração comercial e água filtrada

0201 – Grupo recebendo dieta ração comercial e água filtrada enriquecida com frutose

0301 – Grupo recebendo dieta hiperlipídica e água filtrada

4. Identificar cada caixa com a respectiva dupla de animais. Utilize uma ficha/cartão padrão plastificado a ser fixado na parte externa de cada caixa;
 - ⇒ Número do CEUA
 - ⇒ Nome do pesquisador responsável
 - ⇒ Telefone de contato para emergências
 - ⇒ Identificação do grupo experimental
 - ⇒ Identificação dos animais
 - ⇒ Número da gaiola

Protocolo 2- Mensuração do peso dos animais

ITENS NECESSÁRIOS: Ficha de monitoramento do peso, caneta, balança digital, pilhas, caixa para pesar animais, luvas para manipular animal.

Para a mensuração do peso dos animais adotar o seguinte protocolo:

- 1- No dia anterior até o momento de pesagem dos animais não suspender a ingestão de ração e de água;
- 2- No dia da pesagem dos animais escolher um horário para a pesagem dos animais e registrá-lo. Por ordem de ID prosseguir com a pesagem dos animais. O horário de pesagem dos animais e a ordem dos mesmos deverá ser mantida nos experimentos seguintes;
- 3- Separar uma caixa para que o animal possa ser acondicionado durante a pesagem;

- 4- Ligar a balança e certificar-se que a mesma se encontra zerada;
- 5- Colocar a caixa sobre a superfície da balança de forma centralizada e na sequência tarar a balança. Pegue o animal pelo dorso e transfira-o da gaiola para a caixa, após estabilização da balança registre o peso do animal adotando duas casas decimais como referência. Repita esse processo 3 dias consecutivos e posteriormente calcule a média de peso. Registre o peso final nas respectivas fichas de avaliação;
- 6- Repetir esse procedimento nos 3 últimos dias antes de iniciar cada proporção (1:1; 2:1; 4:1) da DC e nos 3 últimos dias de experimento;
- 7- No **T0** de experimentação e antes do início da dieta calcule a média de peso e o IMC (Índice de Lee) dos animais. Após essa etapa, distribua os animais entre os grupos de intervenção de modo que cada grupo fique pareado;
- 8- Utilizar formulário padrão para registrar o peso dos animais por grupo experimental, por dia, por gaiola, por animal e sua respectiva média;
- 9- O pesquisador deve assinar o formulário ao término de cada dia de monitoramento;

Protocolo 3 - Mensuração do comprimento nasocaudal dos animais

ITENS NECESSÁRIOS: ficha de monitoramento do comprimento, caneta, luvas para manipular animal, régua de 30 cm, fita crepe.

- 1- No **T0**, **T4** e **T5** realizar a mensuração do comprimento dos animais sem suspensão da ingestão de ração e água;
- 2- Pegue o animal pelo dorso e coloque o mesmo em posição ventral em uma superfície plana;
- 3- Utilizando uma fita métrica inelástica ou uma régua, fixada com fita crepe em uma superfície plana;
- 4- Posicione o animal de forma paralela à fita/régua e faça a aferição da medida nasocaudal, conforme **Figura 1**;
- 5- Repita 3 vezes consecutivas essa medida e registre o comprimento do animal utilizando uma casa decimal de referência;
- 6- Calcule a média do comprimento nasocaudal de cada dia de coleta.
- 7- O pesquisador deve assinar o formulário ao término de cada dia de monitoramento.

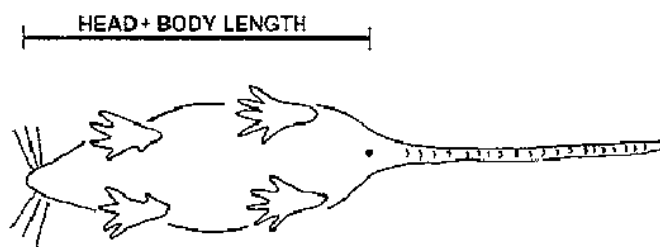


Figura 1. Aferição da medida nasocaudal.

Protocolo 4 - Avaliação de ingestão hídrica e de ração

ITENS NECESSÁRIOS: Formulário para registro de consumo hídrico, formulário para registro de consumo de ração, luvas para manipulação de animais, caneta, proveta graduada, balança digital, pilhas.

- 1- A ingestão hídrica e de ração será avaliada e registrada durante três dias consecutivos e, posteriormente, será obtido uma média por gaiola e por animal, considerando que cada gaiola terá 2 animais;
- 2- Determinar um horário para dispor a ração e a água nas gaiolas, e no dia seguinte no mesmo horário seguir com o registro de consumo;
- 3- Antes de distribuir a ração e a água nas gaiolas:
 - Pese a ração utilizando balança de precisão e registre o peso em gramas usando uma casa decimal;
 - Meça a quantidade de água usando uma proveta e anote a quantidade em ml administrada;
- 4- No dia seguinte pesar e medir o volume de sobra de ração e água por gaiola e registrar na ficha de avaliação e completar com mais ração e água, fazendo o devido registro;
- 5- Deverá ser considerado como sobra de ração apenas a quantidade armazenada na grade de alimentação, sobras que estejam dentro da gaiola devem ser desconsideradas;
- 6- Utilizar formulário padrão para registrar a ingestão hídrica e de ração por grupo experimental, por dia, por gaiola, por animal e sua respectiva média;
- 7- O pesquisador deve assinar o formulário ao término de cada dia de monitoramento.

Protocolo 5 – Monitoramento da cetose sanguínea e glicemia

ITENS NECESSÁRIOS: xilol, algodão/cotonete, luvas, agulha para punção 18x30/seringa de insulina, fita de cetose, fita de glicose, monitor de cetose/glicose, formulário padrão para registro de cetose sanguínea e glicemia.

- 1- O monitoramento da cetose sanguínea e glicemia serão realizados entre o momento T4 e T5 e no final do experimento (T5);
- 2- O sangue deve ser coletado pela cauda de cada animal;
- 3- Para facilitar a punção da veia caudal será aplicado com algodão xilol e após 5 minutos será realizada a punção;
- 4- O sangue será aplicado diretamente sobre a fita de cetose/glicose e essa será imediatamente lida pelo monitor;
- 5- Utilizar formulário padrão para registrar os valores de cetose sanguínea e de glicemia por animal e por dia;
- 6- O pesquisador deve assinar o formulário ao término de cada dia de monitoramento.

Protocolo 6 – Eutanásia dos animais, coleta de sangue e retirada de órgãos

ITENS NECESSÁRIOS: caixa de armazenagem (10x10 cm), cilindro de gás carbônico, guilhotina, isopor, alfinetes, pinças, tesouras cirúrgicas, bisturis;

1. Identifique cada formulário conforme grupo, ID e data. Prepare 01 ficha para cada animal;
2. O animal deve ser colocado em caixa de armazenagem, a qual deve ser tampada por um objeto de vidro que tenha um acesso central para receber, com o auxílio de uma mangueira, o gás carbônico advindo do cilindro;
3. Esperar por cerca de 1 minuto e meio (quando o animal estiver desmaiado), desligar o cilindro, esperar por mais 1 minuto e guilhotina-lo;
4. Após a decapitação, coletar o sangue utilizando 1 tubo falcon de 50 ml, previamente identificado, contendo 5 ml de EDTA a 10% (espera-se obter de 4-5 ml de sangue). Homogeneizar o sangue com EDTA, vagarosamente;
5. Mantenha o tubo falcon protegido da luz e imediatamente transferido para a geladeira;
6. O sangue obtido será centrifugado (3000 rpm, 15 min, 4°C), sendo o sobrenadante transferido para uma proveta para aferição e registro do volume;
7. Acrescentar os inibidores de proteases, aprotinina (10 µg/mL), benzamidina (10 µM), fluoreto de fenilmetilsulfonila-PMSF (5 µM) e o antioxidante 2,6-di-tert-butil-p-hidroxitolueno-BHT (100 µM), conforme proporção de plasma obtido;
8. Distribuir plasma em cada eppendorf identificado e distribuir volumes, conforme tipos e quantidades de análises a serem feitas;
9. Transportar 1,5-2 ml do concentrado de hemácias para tubo eppendorf de 2-3 ml;
10. Armazenar plasma e hemácias a -80°C até momento das análises;
11. Em paralelo a armazenagem no sangue coletado na geladeira, iniciar procedimento cirúrgico para retirada dos órgãos perfundidos, utilizando isopor para posicionar o animal, alfinetes para fixar os animais ao isopor, pinças, tesouras cirúrgicas, bisturis para coleta dos órgãos;
12. Identificar cada órgão, fazer limpeza por imersão em solução fisiológica, pesar e registrar em formulário padrão;
13. Seguindo proporcionalidade anatômica, cada órgão deverá dividido em 2 partes. Uma das partes irá para a preparação de lâminas (H/E, imuno-histoquímica), sendo assim, armazenados embalados em papel alumínio no freezer -80°C;
14. A outra parte dos tecidos serão armazenados em formaldeído e mantidos em geladeira até a realização das análises;
15. Utilizar formulário padrão para registrar as informações referentes à coleta de sangue total, eutanásia e retirada de órgãos, segundo grupo experimental, dia, por animal;
16. O pesquisador responsável por cada etapa deve assinar o formulário ao término de cada dia de monitoramento.

Apêndice 2. Fichas de monitoramento dos animais.



MONITORAMENTO DO PESO DO ANIMAL

ID: _____ **CEUA:** _____

MOMENTO DO ESTUDO: _____

Peso – dia 1 (g): _____ **Data:** ___/___/___ **Horário:** _____

Peso – dia 2 (g): _____ **Data:** ___/___/___ **Horário:** _____

Peso – dia 3 (g): _____ **Data:** ___/___/___ **Horário:** _____

Média do Peso (g): _____

Pesquisador: _____

ID: _____ **CEUA:** _____

MOMENTO DO ESTUDO: _____

Peso – dia 1 (g): _____ **Data:** ___/___/___ **Horário:** _____

Peso – dia 2 (g): _____ **Data:** ___/___/___ **Horário:** _____

Peso – dia 3 (g): _____ **Data:** ___/___/___ **Horário:** _____

Média do Peso (g): _____

Pesquisador: _____

MONITORAMENTO DO COMPRIMENTO NASOCAUDAL DO ANIMAL**ID:** _____ **CEUA:** _____**MOMENTO DO ESTUDO:** _____ **Data:** ___/___/___

Horário: _____

Comprimento – dia 1 (cm): _____

Comprimento – dia 1 (cm): _____

Comprimento – dia 1 (cm): _____

Média do Comprimento – dia 1 (cm): _____**Pesquisador:** _____**ID:** _____ **CEUA:** _____**MOMENTO DO ESTUDO:** _____ **Data:** ___/___/___

Horário: _____

Comprimento – dia 1 (cm): _____

Comprimento – dia 1 (cm): _____

Comprimento – dia 1 (cm): _____

Média do Comprimento – dia 1 (cm): _____**Pesquisador:** _____

ID: _____ CEUA: _____

MOMENTO DO ESTUDO: _____

Consumo de água – dia 1 (g): _____ Data: ___/___/___ Horário:
_____Consumo de água – dia 2 (g): _____ Data: ___/___/___ Horário:
_____Consumo de água – dia 3 (g): _____ Data: ___/___/___ Horário:

Média do consumo de água (g): _____

Pesquisador: _____

ID: _____ CEUA: _____

MOMENTO DO ESTUDO: _____

Consumo de água – dia 1 (g): _____ Data: ___/___/___ Horário:
_____Consumo de água – dia 2 (g): _____ Data: ___/___/___ Horário:
_____Consumo de água – dia 3 (g): _____ Data: ___/___/___ Horário:

Média do consumo de água (g): _____

Pesquisador: _____

ID: _____ CEUA: _____

MOMENTO DO ESTUDO: _____

Consumo de ração – dia 1 (g): _____ Data: ___/___/___ Horário: _____

Consumo de ração – dia 2 (g): _____ Data: ___/___/___ Horário: _____

Consumo de ração – dia 3 (g): _____ Data: ___/___/___ Horário: _____

Média do consumo de ração (g): _____

Coeficiente de Eficácia Alimentar (CEA): _____

Pesquisador: _____

ID: _____ CEUA: _____

MOMENTO DO ESTUDO: _____

Consumo de ração – dia 1 (g): _____ Data: ___/___/___ Horário: _____

Consumo de ração – dia 2 (g): _____ Data: ___/___/___ Horário: _____

Consumo de ração – dia 3 (g): _____ Data: ___/___/___ Horário: _____

Média do consumo de ração (g): _____

Coeficiente de Eficácia Alimentar (CEA): _____

Pesquisador: _____



MONITORAMENTO DE CETOSE E GLICEMIA SANGUÍNEA

ID: _____ CEUA: _____		
MOMENTO DO ESTUDO: _____		
	CETOSE SANGUÍNEA	GLICEMIA
DATA		
Pesquisador: _____		

ID: _____ CEUA: _____		
MOMENTO DO ESTUDO: _____		
	CETOSE SANGUÍNEA	GLICEMIA
DATA		
Pesquisador: _____		



FICHA DA EUTANÁSIA

CEUA: _____ ID: _____

Grupo: _____

Data __/__/__ Horário: __: __ até __: __

Técnica de eutanásia: Guilhotina

Responsável: _____

Técnica de fixação:

Solução de fixação: _____

Quantidade: _____

Responsável: _____

Retirada de órgãos:

ÓRGÃO	LIMPEZA	PESO
Cérebro (restante)		
Hipocampo		
Hipotálamo		
Lobo frontal		
Rins		
Fígado		
Coração		
Baço		
Pâncreas		
Pulmões		

Intestino		
TA visceral		
TA subcutâneo		
Músculo		

Responsável: _____

Destino da carcaça:

Armazenagem da carcaça: _____

Lacre: _____

Local de descarte: _____

Responsável pelo descarte: _____

ANEXOS

Anexo 1. Termo de outorga e aceitação de auxílios da FAPESP



Para uso exclusivo da FAPESP
Processo: 2020/03529-6
Data Impressão: 08/12/2020 10:00:23
Folha: _____
Volume: _____
Rubrica: _____

FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO
TERMO DE OUTORGA E ACEITAÇÃO DE AUXÍLIOS
PROCESSO 2020/03529-6

<p>Pelo presente instrumento, a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, com sede na Rua Pio XI, nº 1.500, Alto da Lapa, São Paulo, Capital, inscrita no CNPJ/MF sob nº 43.828.151/0001-45, doravante denominada OUTORGANTE, por meio de seu Conselho Técnico-Administrativo, nos termos do Artigo 14, letra "b", da Lei Estadual nº 5.918, de 18 de outubro de 1960, concede ao OUTORGADO, a seguir qualificado, Auxílio para a realização do Projeto de Pesquisa a seguir especificado, nas instalações e com o apoio da INSTITUIÇÃO SEDE, de acordo com as especificações, cláusulas e condições descritas a seguir e nos Anexos, que passam a ser parte integrante deste Termo.</p>	
1. OUTORGADO:	Nágia Raquel Teixeira Damasceno CPF: 480.082.493-15 RG: 39202677-08P/SP
2. Correspondência:	Rua Anete Guelroz Lacerda - 136, Jardim Bonfiglioli, São Paulo/SP, CEP 05591-080 nagia@usp.br
3. Instituição Sede:	Faculdade de Saúde Pública/FSP Universidade de São Paulo/USP
4. Projeto de Pesquisa:	Dieta cetogênica e Epilepsia: Uma abordagem nutricional focada na modulação morfofuncional do eixo cérebro-intestino e seus aspectos lipídicos, oxidativos e inflamatórios
5. Linha de Fomento:	Programas Regulares / Auxílios a Pesquisa / Projeto de Pesquisa / Projeto de Pesquisa - Regular
6. Área/Subárea:	Nutrição Bioquímica da Nutrição
7. Coordenação:	Saúde I
8. Período da Vigência:	01/02/2021 a 31/01/2023
9. Relatórios Científicos:	30/01/2022, 28/02/2023
10. Prestações de Contas:	28/02/2022, 28/02/2023

Anexo 2. Termo de Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CEUA-FMUSP).



Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Avenida Dr. Arnaldo, 455
Pacaembu – São Paulo – SP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que a proposta intitulada “Dieta cetogênica e Epilepsia: Uma abordagem nutricional focada na modulação morfofuncional do eixo cérebro-intestino e seus aspectos lipídicos, oxidativos e inflamatórios”, registrada com o nº 1696/2021, sob a responsabilidade de Nágila Raquel Teixeira Damasceno e Júlia Galbiati de Souza, apresentada pela Faculdade de Saúde Pública da USP - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em 05/11/2021

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 01-12-2021 Término: 31-12-2022
Espécie/linhagem/raça	Rato wistar
Nº de animais	56
Peso/Idade	8 semanas
Sexo	machos
Origem	Biotério do ICB

A CEUA FMUSP solicita que ao final da pesquisa seja enviado Relatório com todas as atividades.

CEUA-FMUSP, 05 de novembro de 2021

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Comissão de Ética no Uso de Animais da FMUSP
e-mail: ceua@fm.usp.br

Anexo 3. Termo de Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (CEUA-IPEN).



Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Impacto dos ácidos graxos ômega-3 na dieta cetogênica: Características morfofuncionais do cérebro, comportamentais, controle de crises e efeitos adversos associados ao estresse oxidativo e metabolismo lipídico", registrada com o nº 273/20, sob a responsabilidade de Emerson Soares Bernardes, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica ou ensino, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela CEUA-IPEN - Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN/CNEN-SP) em 19/11/2020.

We certify that the proposal titled "Impact of omega-3 fatty acids on the ketogenic diet: Brain morphofunctional, behavioral characteristics, crisis control and adverse effects associated with oxidative stress and lipid metabolism", registration number 273/20, under the responsibility of Emerson Soares Bernardes, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the CEUA-IPEN - Ethic Committee on Animal Use of the Nuclear and Energy Research Institute (IPEN/CNEN-SP) in 11/19/2020.

Finalidade:	Pesquisa Científica
Vigência da autorização:	Janeiro/2021 a Junho/2023
Espécie/linhagem/raça:	Rattus norvegicus Rato heterogênico Wistar
Nº de animais:	60
Peso/idade:	6 a 8 semanas - 200 a 300 g
Sexo:	Machos
Origem:	Biotério de Produção de Ratos do ICB/USP

São Paulo, 19 de Novembro de 2020.


Patrick J. Spencer
Coordenador da CEUA-IPEN

Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN-CNEN/SP)
Centro de Biotecnologia
Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 - Cidade Universitária - CEP: 05508-000 - São Paulo - Estado de São Paulo
Telefone: (011) 3133-9696 - E-mail: ceuapen@ipen.br