

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO

ROBERTA DE ARAÚJO GOUVEIA

**EFEITOS PSICOFARMACOLÓGICOS DO ÓLEO DE KRILL EM
CAMUNDONGOS SWISS**

JOÃO PESSOA – PB

2016

ROBERTA DE ARAÚJO GOUVEIA

**EFEITOS PSICOFARMACOLÓGICOS DO ÓLEO DE KRILL EM
CAMUNDONGOS SWISS**

JOÃO PESSOA – PB

2016

ROBERTA DE ARAÚJO GOUVEIA

**EFEITOS PSICOFARMACOLÓGICOS DO ÓLEO DE KRILL EM
CAMUNDONGOS SWISS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição, Departamento de Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Nutrição.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Liana Clébia de Moraes Pordeus

JOÃO PESSOA – PB

2016

G719e Gouveia, Roberta de Araújo.
Efeitos psicofarmacológicos do óleo de krill em
camundongos / Roberta de Araújo Gouveia.- João Pessoa,
2016.
54f. : il.
Orientadora: Liana Clébia de Moraes Pordeus
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS
1. Nutrição. 2. Lipídios. 3. Óleo de krill. 4. Convulsão.
5. Ansiedade.

UFPB/BC

CDU: 612.39(043)

ROBERTA DE ARAÚJO GOUVEIA

**EFEITOS PSICOFARMACOLÓGICOS DO ÓLEO DE KRILL EM
CAMUNDONGOS SWISS**

Dissertação _____ em ____ / ____ /2016.

BANCA EXAMINADORA

Liana Clébia de Morais Pordeus

Prof.ª. Dr.ª. Liana Clébia de Morais Pordeus – PPGCN/CCS/UEPB
Coordenadora da Banca Examinadora

M.ª. da Conceição R. Gonçalves

Prof.ª. Dr.ª. Maria da Conceição Rodrigues Gonçalves – PPGCN/CCS/UEPB
Examinador Interno

Temilce Simões de Assis

Prof.ª. Dr.ª. Temilce Simões de Assis – PFP/CCS/UEPB
Examinador Externo

M.ª. José de C. Costa

Prof.ª. Dr.ª. Maria José de Carvalho Costa – PPGCN/CCS/UEPB
Examinador Suplente Interno

Patrícia Vasconcelos Leitão Moreira

Prof.ª. Dr.ª. Patrícia Vasconcelos Leitão Moreira – DN/CCS/UEPB
Examinador Suplente Externo

AGRADECIMENTOS

Ao nosso Pai celestial, pelas suas misericórdias que se renovam a cada manhã, nos proporcionando saúde e sabedoria para sermos testemunhos de seu amor incondicional.

Ao meu esposo (Sebastião) e aos meus filhos (Lorena e Enzo) por entenderem que o motivo da minha ausência é para lhes proporcionar um futuro melhor.

Aos meus familiares, meus pais e irmãos pela força e confiança.

À Prof^a Dr^a. Liana Clébia de Moraes Pordeus, não apenas pela orientação, mas pela pessoa especial que é, sempre buscado ajudar ao semelhante, sendo companheira e parceira nas alegrias e tristezas.

Aos membros internos da banca examinadora: Prof^a Dr^a. Maria da Conceição Rodrigues Gonçalves e a Prof^a Dr^a. Maria José de Carvalho Costa pela atenção e sugestões que visaram à melhoria desse trabalho.

Aos membros externos da banca examinadora: Prof^a Dr^a. Patrícia Vasconcelos Leitão Moreira e Prof^a. Dr^a. Temilce Simões de Assis, pela atenção e sugestões que visaram à melhoria desse trabalho.

A todos os professores que fazem parte do Programa de Pós-graduação em Ciências da Nutrição (PPGCN) pelo aprendizado.

Aos colegas da turma pela convivência e parceria.

As amigas e companheiras de todas as horas: Adélia da Costa Pereira de Arruda Neta, Camyla Rocha de Carvalho Guedine, Claudenise Caldas da Silva Dantas, Jousianny Patrício da Silva, Keyth Sulamita de Lima Guimarães, Vanessa Resende de Luna

À direção do Hospital Universitário Lauro Wanderley (HULW), na pessoa do Prof^o. Dr^o. Arnaldo Correia de Medeiros, pelo confiança e apoio de sempre.

A chefia do setor de apoio terapêutico, na pessoa de Adir Fátima de Rosa Andrade.

A coordenação da unidade de nutrição, na pessoa de Regina Maria Cardoso Monteiro pelo apoio e confiança.

As minhas colegas nutricionistas do Hospital Universitário Lauro Wanderley (HULW), em especial a Adriana Gomes Cesar Carvalho que sempre esteve ao meu lado.

Aos funcionários do PPGCN, em especial ao Sr. Carlos Fernando da Silva.

Ao Sr. José Crispim Duarte, coordenador do biotério Prof. Dr. Thomas George pela presteza durante a pesquisa.

Aos animais que tornaram possível a realização dessa pesquisa, meu carinho e respeito.

A equipe do laboratório de psicofarmacologia que esteve comigo do início ao fim com compromisso, ética e profissionalismo: Camila Castro, Géssica Almeida de Freitas e Sandy Ferreira Martins.

A todos que de alguma maneira contribuíram para execução desse trabalho.

**“O tempo muito me ensinou, ensinou a amar a vida, não desistir de lutar,
renascer na derrota, renunciar às palavras e pensamentos negativos,
acreditar nos valores humanos e a ser otimista.
Aprendi que mais vale tentar do que recuar.
Antes acreditar do que duvidar,
que o que vale na vida,
não é o ponto de partida e sim a nossa caminhada”.**
Cora Coralina.

RESUMO

A epilepsia é uma doença caracterizada por transtornos neurológicos de longa duração, onde o episódio mais grave dessa patologia está associado a crises de convulsão. A ciência vem buscando novos fármacos, assim como tratamentos não convencionais para fornecer qualidade de vida aos indivíduos acometidos por essa doença. Há evidências científicas de uma associação entre o conteúdo de ácidos graxos da dieta e mudanças específicas no sistema de neurotransmissão, com destaque para os ácidos graxos poliinsaturados, que são capazes de alterar a excitabilidade neuronal, agirem como neuroprotetores, além de possuírem ação anticonvulsivante. O presente estudo teve como objetivo investigar os possíveis efeitos anticonvulsivantes do óleo de krill (rico em ácidos graxos poliinsaturados) no sistema nervoso central de camundongos, avaliando ainda se o mesmo interfere na atividade locomotora e/ou no relaxamento muscular, bem como se possui efeitos sedativos comuns a fármacos anticonvulsivantes. Foram utilizados 100 camundongos Swiss machos, divididos em Grupo Controle (GC) que recebeu água destilada, e Grupo Krill (GK), que recebeu o óleo de krill, ambos por gavagem sendo a quantidade administrada 1mL/100g de peso do animal/dia, durante 30 dias. As alterações comportamentais foram analisadas no 31º dia por meio dos experimentos convulsivantes (pilocarpina, eletro-choque e pentilenotetrazol), experimentos ansiolíticos (monitor de atividade, campo aberto, rota-rod e o labirinto em cruz elevado). No teste do eletro-choque o grupo submetido à suplementação com óleo de krill apresentou um menor tempo de convulsão quando comparado ao grupo controle. No teste pentilenotetrazol (PTZ) o GK obteve uma maior latência para o aparecimento da primeira convulsão, além da diminuição das convulsões tônicas e tônico-clônicas, quando comparado ao GC. No aparelho do campo aberto, foi observado um aumento do tempo de imobilidade, redução na frequência de entrada nos quadrantes centrais do grupo krill, além de uma redução na ambulação periférica quando comparado ao grupo controle. No teste do monitor de atividades, os animais do grupo suplementado percorreram uma menor distância, com menor tempo de atividade e uma menor velocidade, quando comparado ao grupo controle. A análise dos resultados do número de entrada, tanto nos braços abertos quanto nos braços fechados do labirinto, bem como o tempo de permanência nos braços abertos, não demonstrou significância estatística, o mesmo foi aplicado para o teste de pilocarpina e o rota rod. Diante do exposto o óleo de krill é um possível candidato ao tratamento coadjuvante da convulsão.

Palavras-chave: Lipídios. Óleo de krill. Convulsão. Ansiedade.

ABSTRACT

Epilepsy is a neurological disease characterized by long duration disorders, where the most severe episode of this disorder is associated with seizure attacks. Science has been seeking new drugs, as well as unconventional treatments to provide quality of life for individuals affected by this disease. There is scientific evidence of an association between the fatty acid content of the diet and specific changes in neurotransmission system, especially polyunsaturated fatty acids, which are able to alter neuronal excitability, act as neuroprotective, in addition to possess anticonvulsant. This study aimed to investigate the possible anticonvulsant effects of krill oil (rich in polyunsaturated fatty acids) in the central nervous system of mice, evaluating even if it interferes with locomotor and / or muscle relaxation activity, and it has effects sedatives common to anticonvulsant drugs. We used 100 male Swiss mice were divided into control group (CG) received distilled water and krill Group (GK), which received the krill oil, both by gavage and the amount administered 1ml/100g of animal weight / day, for 30 days. Behavioral changes were analyzed on the 31st day through convulsive experiments (pilocarpine, electroshock and pentylenetetrazol), anxiolytics experiments (activity monitor, open, rota-rod and the elevated plus-maze). In the electroshock test the group submitted to supplementation with krill oil presented a shorter seizure when compared to the control group. In pentylenetetrazol test (PTZ) GK obtained a higher latency to onset of first seizure in addition to the reduction in tonic seizures and tonic-clonic, when compared to the CG. In the apparatus of the open field, it was observed an increase in immobility time, reduction in input frequency in the central quarters of the krill group, plus a reduction in peripheral ambulation compared to the control group. In Activity Monitor test, animals in the supplemented group traveled a shorter distance, less uptime and lower speed when compared to the control group. The results of the entry number in both the open arms and in the closed arms of the maze as well as the time spent in the open arms was not statistically significant, it was applied to pilocarpine and the test route rod. On krill oil the above is a possible candidate for the adjunctive treatment of seizures.

Keywords: Lipids. Krill oil. Convulsion. Anxiety.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Dissertação

Figura 1. Hipótese sobre os possíveis mecanismos anticonvulsivantes da dieta cetogênica.....	19
Figura 2. Esquema do desenho experimental.....	22
Figura 3. Aparelho Eletrochoque Auricular.....	24
Figura 4. Aparelho Campo Aberto.....	26
Figura 5. Aparelho Rota Rod.....	27
Figura 6. Aparelho Labirinto em Cruz Elevado.....	28
Figura 7. Aparelho Monitor de Atividade.....	28

Artigo

Figura 1. Efeito do óleo de krill sobre o número de convulsões tônico-clônicas em camundongos submetidos ao teste do eletro-choque	40
Figura 2. Efeito do óleo de krill sobre o número de convulsões tônicas em camundongos submetidos ao teste do eletro-choque.....	40
Figura 3. Efeito do óleo de krill sobre o tempo de convulsão em camundongos submetidos ao teste do eletro-choque.....	40
Figura 4. Efeito do óleo de krill sobre a latência para o aparecimento da primeira convulsão no teste das convulsões induzidas pelo pentilenotetrazol	41
Figura 5. Efeito do óleo de krill sobre o número de convulsões a) clônicas e b) tônico-clônicas no teste das convulsões induzidas pelo pentilenotetrazol	42

LISTA DE QUADROS

Dissertação

Quadro 1. Classificação das crises epiléticas	15
Quadro 2. Classificação da crise epilética por gravidade	25

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 EPILEPSIA	14
2.2 IMPORTÂNCIA DA NUTRIÇÃO NAS DOENÇAS NEUROLÓGICAS	16
2.3 ÓLEO DE KRILL	19
3 MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1 MATERIAL PARA ANÁLISE	22
3.2 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO	22
3.3 CONDIÇÕES DE MANUTENÇÃO E EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL	23
3.4 TESTES EXPERIMENTAIS	23
3.4.1 Estudo da atividade anticonvulsivante	23
3.4.1.1 Teste de Convulsão Induzido pelo Eletrochoque Auricular	23
3.4.1.2 Teste de Convulsão Induzido pelo Pentilenotetrazol	24
3.4.1.3 Teste de Convulsão Induzido por Pilocarpina	25
3.4.2 Estudo da atividade sedativa e ansiolítica	26
3.4.2.1 Campo Aberto	26
3.4.2.2 Rota Rod	27
3.4.2.3 Teste do Labirinto em Cruz Elevado	27
3.4.2.4 Monitor de Atividade	28
3.5 EUTANÁSIA	29
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	29
REFERÊNCIAS	30
APÊNDICE	35
ARTIGO	36
OUTROS RESULTADOS	47
ANEXO	53

1 INTRODUÇÃO

O sistema nervoso central é o segundo órgão com maior conteúdo de lipídios do corpo humano, perdendo apenas para o tecido adiposo, com o equivalente a 60% de conteúdo lipídico (TAHA; BURNHAM; AUVIN, 2010). Sendo assim, os ácidos graxos estão entre as moléculas mais importantes que determinam a integridade e o desenvolvimento do cérebro (CHANG; KE; CHEN, 2009).

Há evidências científicas de uma associação entre o conteúdo de ácidos graxos da dieta e mudanças específicas no sistema de neurotransmissão no cérebro de ratos, com destaque para os ácidos graxos poliinsaturados. Os ácidos graxos poliinsaturados alteram a excitabilidade neuronal e são neuroprotetores, além de possuírem ação anticonvulsivante (SIERRA et al., 2012). Dentre os benefícios dos ácidos graxos poliinsaturados temos a melhora da função cognitiva, aumentando a capacidade de aprendizado e memória (MULDOON et al., 2010).

Um dos ácidos graxos mais importante neste processo é o ômega 3, que na sua deficiência crônica ocorre uma redução na ligação ao receptor de dopamina e aumenta a densidade do receptor serotonina no córtex frontal de ratos jovens e idosos, além de alterar o metabolismo da dopamina (ZIMMER et al., 1998), com consequências como o aparecimento de sintomas de doenças como o transtorno de humor e esquizofrenia, devido ao aumento da disponibilidade da dopamina no corpo estriado dorsal (BONDI et al., 2014).

A epilepsia é um grupo de distúrbios neurológicos crônicos caracterizadas por convulsões, que são resultado da atividade neuronal anormal, excessiva ou hipersincrônica no cérebro (ENGEL, 2006). Esta patologia atinge mais de 50 milhões de pessoas no mundo, sendo 40 milhões delas em países em desenvolvimento, atingindo pessoas de todas as raças, sexos e condições socioeconômicas (MARANHÃO; GOMES; CARVALHO, 2011).

Embora muitos distúrbios convulsivos sejam conhecidos há décadas, muito pouco se evoluiu no mecanismo e tratamentos eficazes, com anticonvulsivantes que geralmente não eliminam as crises. Por esta razão, nos últimos anos, além do tratamento farmacológico, estão sendo empregadas estratégias de tratamento não farmacológico para epilepsias refratárias dentre elas, destaca-se o uso dos ácidos graxos poliinsaturados (PARMET; LYNM; GOLUB, 2011).

O óleo de krill é um nutracêutico, obtido de um tipo de crustáceo (*Euphausia superba*), rico em ácidos graxos poliinsaturados, além de ser uma excelente fonte de ácido eicosapentaenoico (EPA) e ácido docosaexaenoico (DHA) (MAKI et al., 2009). Uma das vantagens desse composto, é que ele é armazenado na forma de fosfolipídio, compondo a

membrana celular, exercendo uma função estrutural, não sendo apenas armazenado como na forma de triglicerídeos (KONAGAI, et al., 2013).

Um ensaio clínico em humanos demonstrou que o consumo do óleo de krill foi capaz de melhorar o controle da síndrome metabólica, através da redução dos triglicerídeos, do colesterol total, colesterol LDL, aumento do colesterol HDL, além de reduzir a glicemia (BUNEA; FARRAH; DEUTSCH, 2004).

Em relação ao sistema nervoso central, esse composto melhorou a resposta cognitiva, o aprendizado, além de minimizar distúrbios neurológicos (NEJM et al., 2015). Sendo assim, o óleo de krill vem se destacado como alternativa promissora para auxiliar no tratamento desses distúrbios, dentre eles a epilepsia.

Considerando estes aspectos, o presente estudo teve como objetivo investigar os possíveis efeitos anticonvulsivantes do óleo de krill no sistema nervoso central de camundongos swiss, avaliando ainda se o mesmo interfere na atividade locomotora espontânea e/ou na atividade de relaxamento muscular, bem como os efeitos sedativos comuns a fármacos anticonvulsivantes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 EPILEPSIA

A epilepsia é uma doença crônica, caracterizada por transtornos neurológicos de longa duração, decorrentes de alterações na atividade elétrica neural. A presença de epilepsia é definida pela recorrência de crises convulsivas espontâneas, caracterizada por uma contração violenta dos músculos voluntários, ocasionadas por fatores constitucionais, genéticos ou por anormalidades cerebrais estruturais (FONTENELLE, 2001; NETO; MARCHETTI, 2005; MARANHÃO; GOMES, CARVALHO, 2011).

A convulsão ainda pode ser definida como o resultado de uma despolarização excessiva e anormal de um grupo de neurônios. Assim, sempre que um indivíduo apresentar tal fenômeno está perante uma manifestação clínica que resulta em lesão ou disfunção cerebral transitória ou definitiva. Esse episódio pode ser visto, frequentemente, em indivíduos que apresentam epilepsia na sua forma mais grave (FONTENELLE, 2001).

A epilepsia é um dos transtornos cerebrais mais frequentes, que atinge 50 milhões de pessoas no mundo, envolvendo todas as raças, sexo, condições sócio-econômicas e regiões. (SCOTT; LHATOO; SANDER, 2001).

As taxas de incidência anual de epilepsia na maioria dos estudos internacionais oscilam entre 0,04% a 0,07% (SANDER; SHORVON, 1996), se elevando para 0,122% a 0,19% nos países em desenvolvimento (PLACENCIA et al., 1992).

A epilepsia pode se manifestar em qualquer fase da vida. Nos países industrializados observam-se dois picos de incidência: no primeiro ano de vida (decorrente de processos pré, peri e pós-natais) e após a sétima década de vida (decorrente, entre outros, de doenças neurológicas degenerativas e de lesões vasculares). A incidência e prevalência de epilepsia na faixa etária acima dos 70 anos é duas a três vezes maior que na infância. Em São Paulo, a prevalência de epilepsia é maior em idosos (0,8%). (MARINO; CUKIERT; PINHO, 1986).

A classificação das crises epiléticas é necessária, pois tem como objetivo auxiliar e fornecer a equipe médica, informações necessárias para o tratamento. As crises convulsivas são classificadas, de acordo com a liga internacional contra epilepsia (1981), em: crises generalizadas, parciais e não classificadas. As crises parciais consistem em evidências clínicas e/ou eletroencefalográficas de um início local, acompanhada ou não de perda da consciência, sendo subdivididas em simples e complexas, sendo a primeira sem alteração da consciência e a

complexa caracterizada por alteração da consciência (FONTENELLE, 2001; NETO; MARCHETTI, 2005).

Enquanto as crises generalizadas não apresentam qualquer evidência em nível local e são caracterizadas por perda da consciência. As crises não-classificadas são aquelas em que as manifestações convulsivas não permitem definição clara entre a generalizada e a parcial (FONTENELLE, 2001; NETO; MARCHETTI, 2005) (Quadro 1).

Os ataques epiléticos resultam da atividade excessiva e anormal das células nervosas do córtex cerebral. Estima-se que 0,5% a 1% da população mundial apresente epilepsia ativa. Alguns pacientes são refratários, ou seja, mesmo com todos os tratamentos medicamentosos necessários continuam a ter crises (BRASIL, 2010; MARANHÃO; GOMES; CARVALHO, 2011).

Existem dois tipos etiológicos básicos para o desenvolvimento da epilepsia, o distúrbio epileptogênico específico, proveniente de trauma, infecções, neoplasias, má formação vascular, anormalidades genéticas e fatores precipitantes como consumo de álcool, febre e privação do sono, sendo que este fator pode precipitar crises em pessoas com epilepsia ou causar crises em indivíduos sem epilepsia (CALVANO et al., 2010).

As síndromes de Lennox-Gastaut, de Ohtahara e de Dravet são exemplos de algumas epilepsias da infância, sendo estas consideradas catastróficas. Crianças com esses distúrbios apresentam convulsões graves no início da vida e apresentam crises epiléticas de difícil controle ao crescerem, assim proporcionando alto risco de morte súbita (KATSNELSON; BUZSÁKI; SWANN, 2014).

Em 1993, a Liga Internacional contra a Epilepsia, propôs uma definição dos termos que constituem vários fenômenos convulsivos. Convulsão isolada, com um ou mais episódios no espaço de 24 hs; convulsão febril; infecção no sistema nervoso; convulsão neonatal, convulsão ocorrida no primeiro mês de vida; eventos não epiléticos, manifestação não-dependente de descarga neural; convulsões associadas a crises epiléticas (FONTENELLE, 2001).

Quadro 1. Classificação das crises epiléticas com Fontenelle.

1. Crises parciais (focais, locais)
A) Simples
a. Com sintomas motores
b. Com sintomas somatossensoriais ou sensoriais
c. Com sintomas autotômicos

d. Com sintomas psíquicos
B) Complexas
a. Começando como crises simples e progredindo para perda da consciência
b. Com perda da consciência desde o início
2. Crises generalizadas (com ou sem convulsões)
Ausências
Crises mioclônicas
Crises tônicas
Crises tônico-clônicas
Crises atônicas
3. Crises não-classificadas

Fonte: Fontenelle (2001).

2.2 IMPORTÂNCIA DA NUTRIÇÃO NAS DOENÇAS NEUROLÓGICAS

O número de desordens neurológicas atinge 1 bilhão de pessoas em todo o mundo, e estes números tendem a aumentar nos próximos 20 anos, devido ao envelhecimento da população. As doenças neurológicas consistem em desordem no cérebro, na medula óssea, nos nervos periféricos e na junção neuromuscular. O tratamento dessas patologias se baseia em um planejamento global e multidisciplinar, cujo corpo médico é formado por neurologistas, enfermeiros, terapeutas ocupacionais e nutricionistas (COSTA et al., 2010).

Existem distúrbios neurológicos em que a dietoterapia é o principal meio de tratamento, como na adrenoleucodistrofia e na síndrome de Wernick-Korsakoff (CHAVES-CARBALLO, 2003). Entretanto, em alguns distúrbios neurológicos, como a epilepsia, a terapia nutricional serve como coadjuvante nestes pacientes, com destaque para a Dieta Cetogênica (DC).

A DC foi criada em 1921, na Mayo Clinic, por Wilder, com o objetivo de tratar crianças com epilepsia. Partindo da antiga observação clínica, citada na Bíblia (Mateus 17. 14-21), de que o jejum exercia uma ação anticonvulsivante em pacientes epiléticos, Wilder concebeu uma dieta com restrição de carboidratos, taxas minimamente adequadas de proteínas e alto teor de lipídios, a qual mantinha uma produção hepática contínua de corpos cetônicos tanto no estado alimentado quanto no jejum. Em vigência de cetose sanguínea contínua, há uma fase de adaptação do metabolismo cerebral estimada em até 20 dias, da qual os neurônios passam a utilizar os corpos cetônicos em lugar da glicose como principal gerador de energia, e o efeito

terapêutico é a elevação do limiar convulsivo (SWINK; VINING; FREEMAN, 1997). Embora se desconheça o mecanismo de ação exato da DC, alguns autores demonstraram que os níveis sanguíneos de acetoacetato e β -hidroxibutirato guardam relação direta, porém não linear, com o grau de proteção contra crises epiléticas, e talvez esta proteção esteja relacionada com um aumento das reservas cerebrais de energia (VINING, 2002).

Sabe-se que o potencial cetogênico de uma dieta está em sua capacidade de iniciar e manter a produção dos ácidos acetoacético e β -hidroxibutírico, o que depende das quantidades e proporções relativas de lipídios, proteínas e carboidratos contidos nos alimentos ingeridos em cada refeição (WITHROW, 1980).

A glicose anula a produção hepática de corpos cetônicos, via secreção de insulina, porque se converte facilmente em energia, ao passo que os ácidos graxos são oxidados dentro das mitocôndrias, gerando energia de maneira menos eficiente. Em contrapartida, a oxidação dos lipídios também gera como subprodutos os corpos cetônicos, os quais podem servir de combustível alternativo (WITHROW, 1980).

Em uma tentativa de tornar a DC mais palatável e menos constipante, Huttenlocher (1876) utilizou Triglicerídios de Cadeia Média (TCM) como principal fonte lipídica. Como os TCMs são mais cetogênicos que os demais lipídios, é possível oferecer uma maior proporção de proteínas e carboidratos (SWINK; VINING; FREEMAN, 1997). Contudo, eles encerram a desvantagem de induzir diarreia, a qual tende a ceder com a continuação da dieta (HUTTENLOCHER, 1976). Assim, a prática da DC no tratamento da epilepsia infantil abrange duas modalidades básicas: a dieta tradicional ou “clássica” descrita inicialmente, baseada em alimentos com alto teor lipídico como creme de leite, manteiga, maionese, azeite e óleos vegetais, e a dieta à base de TCM. Devido à descoberta de novas drogas anti epiléticas (DAES), a partir da década de 1960, aliada às dificuldades em seguir seus princípios rigorosos, a DC foi relativamente esquecida, embora alguns centros, como a Universidade Johns Hopkins, tenham continuado a usá-la (LIVINGSTON; PAULI; PRUCE, 1977). Tornou-se evidente no decorrer do tempo que pelo menos um quinto das crianças epiléticas não respondia favoravelmente a quaisquer das DAES disponíveis ou precisavam de doses excessivas desses medicamentos, com efeitos colaterais intoleráveis. Desse modo, a popularidade da DC cresceu na década de 1980, e foram publicadas várias séries de casos descrevendo sua eficácia (KINSMAN et al., 1992; VASCONCELOS et al., 1995; VINING et al., 1998).

Costa e colaboradores (2010) realizaram um estudo de revisão com estudos de casos, abordando doenças neurológicas, com um total de 62 pacientes, sendo 55% homens e 45% mulheres e revelaram que todos mostravam epilepsia fármaco resistentes. Diante deste quadro

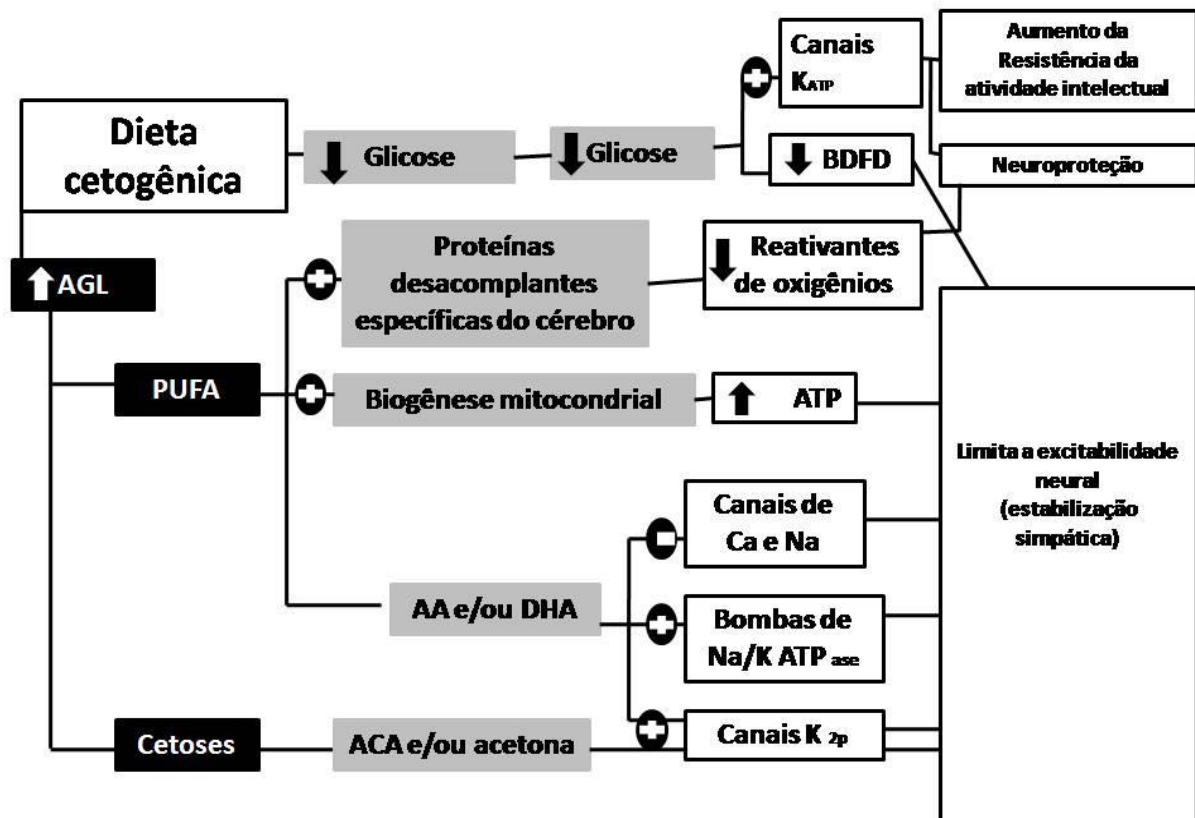
de resistência, foi adotada a DC como opção de tratamento para todos os casos, assim sendo usada uma proporção de macronutrientes 4:1 (lipídios: carboidrato ou proteína). A escolha desse método se deve não só pelo fato de ser um método clássico, mas por permitir o uso de uma maior variedade de alimentos (manteiga, creme de leite, maionese, azeite e óleos vegetais). A eficácia da dieta cetogênica foi relatada por 100% dos autores. A maioria apresentou uma redução de 50% das crises convulsivas como ponto de corte para eficácia. Assim a dieta cetogênica é indicada como opção terapêutica em epilepsias refratárias.

É importante salientar que o planejamento da dieta cetogênica deve ser individualizado e monitorado pelos profissionais da área de saúde para prevenir danos nutricionais. A suplementação com vitaminas e minerais se faz necessária para evitar carências nutricionais que podem acarretar em diminuição da eficácia da DC.

A terapia nutricional para pacientes com distúrbios neurológicos é de suma importância, visto que vitaminas, minerais e ácidos graxos poliinsaturados são fundamentais para tratamento de processos inflamatórios e doenças neurológicas degenerativas (ERBGUTH; HIMMERICH, 2014). Diante do exposto, as doenças neurológicas, convencionalmente conhecidas como irreversíveis, exigem tratamento médico e nutricional especializados.

Na figura 1 abaixo são representadas as hipóteses sobre os mecanismos anticonvulsivantes da dieta cetogênica.

Figura 1. Hipótese sobre os possíveis mecanismos anticonvulsivantes da dieta cetogênica. **AGL**: ácidos graxos livres; **PUFA**: ácidos graxos poliinsaturados; **AA**: ácido araquidônico; **DHA**: docosahexaenoico; **ACA**: acetoacetona; **K_{ATP}**: canais de K⁺ dependentes de ATP; **BDNF**: fator neurotrófico derivado de cérebro; **Ca_v** e **Na_v**: canais de Ca²⁺ e Na⁺ dependentes de voltagem; **K_{2p}**: canais de K⁺ de dois poros.



Fonte: adaptada de Pablos-Sánchez et al. (2014).

2.3 ÓLEO DE KRILL

O óleo de krill é proveniente de um tipo de crustáceo (*Euphausia superba*), o qual é semelhante ao camarão, encontrado nas águas frias da Antártida, que se alimenta de algas profundas do oceano. É constituído por ômega-3, na forma de ácido EPA e DHA, sendo o primeiro correspondente a maior proporção (2:1) e ambos são considerados essenciais para o organismo, assim sendo fundamentais para o funcionamento do cérebro, tanto na vida adulta como no pré-natal e pós-natal, sendo os dois últimos períodos de crescimento cerebral mais pronunciado (PARIS, 2007; PARMET; LYNM; GOLUB, 2011; BERGES et al., 2014).

O seu consumo é proveniente da alimentação, pelas suas fontes como peixes marinhos, frutos do mar e sementes, mas os mesmos também podem ser obtidos por meio de suplementos encapsulados. Os ácidos graxos ômega-3 incluem o ácido alfa-linolênico (ALA), derivado principalmente a partir de fontes vegetais; ácido eicosapentaenóico (EPA) e o ácido docosaexaenóico (DHA), derivados de fontes marinhas (BARROS; POPPE; BONDAM, 2014).

De maneira geral, o consumo desses ácidos graxos têm sido proposto por várias autoridades médicas como uma intervenção nutricional em longo prazo com o objetivo de

preservar a saúde mental, e assim dificultar processos neurodegenerativos, além de também preservar a capacidade cognitiva. Este fato se deve a absorção adequada de antioxidantes e dos ácidos graxos ômega-3 e ômega-6, sendo estes últimos classificados como ácidos poliinsaturados, que quando dosados em proporções ideais exercem uma favorável resposta antiinflamatória, que impedem a iniciação e progressão de desordens neurológicas (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2013; BARROS; POPPE; BONDAM, 2014; NEJM et al., 2015).

Os ácidos graxos ômega-3 são considerados compostos bioativos e têm revelado efetividade ao aumentar e melhorar a capacidade de aprendizagem, assim como a memória e a função cognitiva. O ômega-3 na forma de EPA e DHA tem demonstrado um efeito positivo em relação à doença de Alzheimer, através da redução do risco no desenvolvimento desta patologia (PARRIS, 2007; MARKI et al., 2009; KONAGAI et al., 2013).

Além do papel na construção da estrutura do cérebro como componentes de membranas celulares, eles atuam como mensageiros (moléculas de sinalização) e estão envolvidos na síntese e função de neurotransmissores cerebrais e no sistema imunológico (CHANG; KE; CHEN, 2009).

Os suplementos fontes de ômega-3, na forma de EPA e DHA, como o óleo de Krill, vêm sendo lançados no mercado, por apresentar uma maior quantidade desses compostos bioativos, quando comparado com os peixes de água marinha, que apresentam proporção menor de EPA e DHA. O óleo de krill encapsulado tem conquistado o mercado de nutracêuticos por revelar vários benefícios à saúde, como por exemplo, proteção contra doenças cardiovasculares (GIGLIOTTI et al., 2011).

Outro fator importante a ser relatado é que o ômega-3 do óleo de krill não é armazenado apenas na forma de triglicerídeos, como ocorre no óleo do peixe, mas também exercem função estrutural ao incorporar de 30 a 65% na forma de fosfolipídios, que corresponde a lipídios de membrana celular (GIGLIOTTI et al., 2011).

Um ensaio clínico randomizado, realizado em voluntários idosos saudáveis do sexo masculino, estudou o efeito do óleo de krill na função cerebral e revelou que o ômega-3 presente neste óleo apresentou efeitos benéficos ao ativar a função cognitiva em idosos. Esse resultado pode ser explicado porque a maioria do ômega-3 é incorporada em fosfatidilcolina, assim sendo mais eficaz do que o óleo de sardinha, cujo ômega-3, ácidos graxos poliinsaturados, estão presentes como triglicerídeos (KONAGAI et al., 2013).

Um estudo realizado por Berges et al (2014), ao utilizar a suplementação de óleo de krill, revelou que este óleo teve efeitos benéficos nos níveis séricos de triglicerídeos, além de

não promover aumento dos níveis de LDL em relação ao grupo placebo (azeite). Assim, o estudo sugere que o óleo de krill é uma alternativa promissora na redução de um fator de risco para doenças cardiovasculares, associados a mudanças no estilo de vida.

O grupo de pesquisa de Marzon et al. (2010) estudou o efeito do óleo de krill, comparado aos efeitos do óleo de peixe, no perfil de ácidos graxos do cérebro de roedores. Este estudo mostrou que apenas o óleo de krill foi capaz de aumentar significativamente os níveis de DHA em fosfolípidios cerebrais. Em paralelo, o estudo também revelou o efeito benéfico do óleo de krill no controle da síndrome metabólica.

Wibrand et al. (2013) avaliaram o óleo de krill e seu efeito na função cognitiva em ratos. Este estudo revelou que os componentes bioativos, EPA e DHA, melhoraram a resposta de aprendizagem, além de revelar um potencial efeito antidepressivo, minimizando distúrbios neurológicos. Em concordância, o estudo experimental realizado por Park et al. (2013) revelou uma melhora na memória de ratos jovens, quando administrados óleo de krill, por via oral, de forma repetitiva.

O óleo de krill além de apresentar o ômega 3 como composto bioativo, apresenta a astaxantina, substância antioxidante, a qual é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica e alcançar diferentes regiões cerebrais de mamíferos, prevenindo danos oxidativos a nível cerebral e promovendo melhora cognitiva, o que impulsiona estudos farmacológicos desse composto bioativo (BARROS; POPPE; BONDAN, 2014).

Diante do exposto o óleo de krill, é um composto promissor na melhora da capacidade de aprendizagem, memória e função cognitiva. Sendo assim, o presente estudo tem como objetivo analisar os efeitos desse óleo, em camundongos induzidos a crise convulsiva, como alternativa de tratamento coadjuvante ao tratamento farmacológico.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAL PARA ANÁLISE

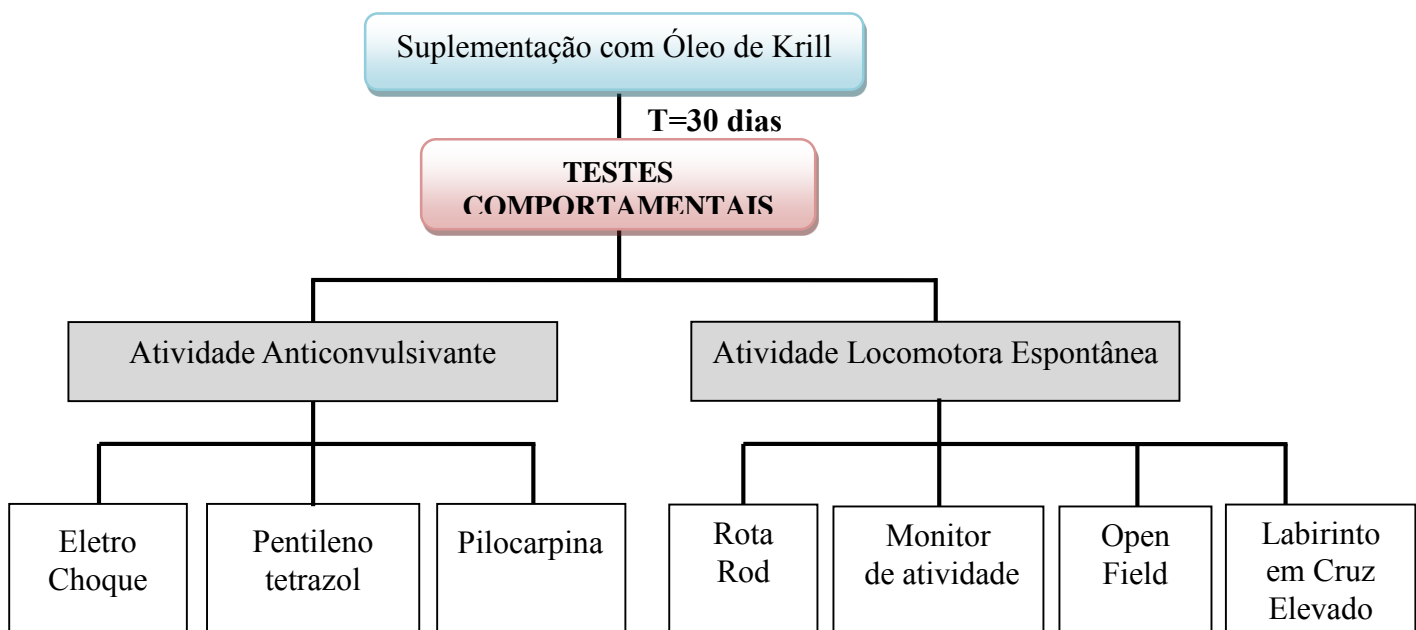
O óleo de krill utilizado no estudo foi obtido através de cápsulas gelatinosas adquiridas em loja especializada de produtos nutricionais, cada cápsula continha 1 mL desse óleo e foram armazenadas na embalagem do fabricante, seguindo as instruções de armazenamento, onde o mesmo era extraído com auxílio de seringa e agulha no momento da gavagem.

3.2 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

Para o desenvolvimento do presente estudo foram utilizados camundongos swiss (n=100), albinos, do sexo masculino, com aproximadamente 30 dias de nascidos e com peso corporal entre 31g e 49g. Todos os animais foram provenientes do biotério Prof. Dr. Thomas George da Universidade Federal da Paraíba.

Os animais foram divididos em Grupo Controle (GC) que recebeu água destilada por gavagem e Grupo Krill (GK) que receberam óleo de krill, ambos com n=10, para cada experimento. Cada grupo de animais recebeu por gavagem 1mL/100g de peso do animal/dia (GUIMARÃES; MÁZARO, 2004), ambos durante 30 dias. Para cada teste comportamental foram utilizados diferentes grupos de animais, submetidos à avaliação 24 horas após o último dia de tratamento.

Figura 2. Esquema do desenho experimental.



3.3 CONDIÇÕES DE MANUTENÇÃO E EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Os animais foram mantidos coletivamente em gaiolas de polipropileno, sendo 05 animais por gaiola, providas de cama de serragem selecionada, com garrafa acoplada a um bico de inox para água, e cocho para ração do tipo peletizada. Alimentados com ração balanceada e água filtrada *ad libitum*. Foram mantidos a temperatura constante ($21 \pm 1^\circ$), ciclo claro e escuro de 12 horas cada, sendo a fase clara de 06:00 às 18:00 horas, de acordo com os padrões recomendados para roedores (MERUSSE; LAPICHICK, 1996).

As gaiolas com os animais foram transferidas para a sala de experimentação comportamental do biotério, com pelo menos seis horas de antecedência à execução dos experimentos, a fim de promover uma adaptação do animal ao novo ambiente e evitar possíveis alterações fisiológicas e comportamentais, decorrentes do estresse causado pelo seu manuseio.

Os testes foram realizados no período vespertino (entre 12:00 e 16:00 horas), sendo previamente higienizados antes dos experimentos, tanto a bancada quanto os aparelhos utilizados durante os testes com solução de etanol a 70%, e, no decorrer do experimento, após observação de cada animal, utilizou-se a solução a 10%, a fim de eliminar resíduos e odores que pudessem interferir no comportamento dos animais, influenciando os resultados.

Os animais foram utilizados uma única vez nos testes anticonvulsivantes, porém, nos testes comportamentais, os mesmos animais foram utilizados para dois testes. Os animais receberam cuidados especiais conforme os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA/91.

O projeto foi analisado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro de Biotecnologia da UFPB e protocolado sob o número 0311/14.

3.4 TESTES EXPERIMENTAIS

3.4.1 Estudo da atividade anticonvulsivante

3.4.1.1 Teste de Convulsão Induzida pelo Eletrochoque Auricular

O teste de convulsão induzido pelo eletrochoque auricular, segundo Merrit e Putman (1938), consiste basicamente na estimulação por meio de pulsos elétricos repetitivos da atividade epiléptica, em que o eletrochoque induz a extensão tônica dos membros inferiores.

Para a avaliação da possível atividade anticonvulsivante do óleo de krill, os animais foram submetidos a estímulo elétrico aplicado através de eletrodos com cliques auriculares (ECT

UNIT 7801, Ugo Basile- Figura 3) nos camundongos e os mesmos foram observados por no máximo 5 segundos (130 V, 150 Hz, 5 s) (DE SOUSA et al., 2009).

Os parâmetros avaliados foram: a) porcentagem de animais que apresentavam convulsão; b) duração da convulsão (tempo de flexão e extensão das patas posteriores) e c) número de mortes (SWINYARD; BROWN; GOODMAN, 1952).

Figura 3. Aparelho eletrochoque auricular



Fonte. INSIGHT-BRASIL.

3.4.1.2 Teste de Convulsão Induzida pelo Pentilenotetrazol

Para avaliar os efeitos anticonvulsivantes foi administrado Pentilenotetrazol (PTZ) no último dia do tratamento, o mesmo corresponde a uma das principais substâncias indutoras de convulsão utilizadas na triagem pré-clínica de novos fármacos anticonvulsivantes, podendo ser utilizado como modelo de crises de ausência, mioclônicas e crises tônico-clônicas generalizadas (RANG et al., 2007). O PTZ atua bloqueando os canais de cloreto associados aos receptores de GABA (LÖSCHER; SCHMIDT, 1988).

Os animais receberam a injeção de 60 mg/kg de PTZ (solúvel em água destilada) via intraperitoneal (i.p.), logo após foram colocados individualmente em caixas de polietileno e observados durante 15 minutos para verificação dos seguintes parâmetros: a) crises convulsivas; b) período de latência (tempo decorrido desde a administração do PTZ até o aparecimento da primeira convulsão), c) duração da crise máxima e d) percentual de mortes (QUINTANS-JÚNIOR et al., 2010; MARQUES et al., 2014).

3.4.1.3 Teste de Convulsão Induzida por Pilocarpina

A pilocarpina é um agonista colinérgico muscarínico utilizado em modelos experimentais para reproduzir a fisiopatologia das crises convulsivas e permite investigar e identificar novos agentes terapêuticos para o tratamento da epilepsia refratária (CÂMPELO et. al, 2011). Estudos anteriores demonstraram que a administração de pilocarpina, induz o desenvolvimento de convulsões, estado de mal epiléptico e lesão cerebral em roedores (CÂMPELO et. al, 2011).

Os animais foram divididos em dois grupos: o grupo experimental que foi tratado com óleo de krill (n= 10) e grupo controle (n= 10). Ambos receberam pilocarpina na dose de 400 mg/kg por via i.p. e observados durante 60 minutos. Após os tratamentos, os grupos foram avaliados de acordo com a classificação da crise epiléptica por gravidade conforme a escala de Racine (1972) (Quadro 2).

Quadro 2. Classificação da crise epiléptica por gravidade no teste da pilocarpina

Grau da severidade da crise	Sinais clínicos da crise
Grau 0	-Ausência de manifestações críticas
Grau 1	-Animal parado (congelamento)
Grau 2	-Movimentos orofaciais, mastigatórios e das vibrissas. - Clonias na cabeça.
Grau 3	-Movimentos tônico-clônicos (uma ou duas patas anteriores) -Crises motoras límbicas com salivação intensa
Grau 4	-Elevação das patas anteriores (rearing) com clonias nestas extremidades e queda do animal para um dos lados
Grau 5	- Crise (clonias) também nas patas posteriores com generalização - Crise tônica generalizada com períodos de pausas respiratórias e cianose
Grau 6	- Morte do animal

Fonte: Racine (1972).

3.4.2 Estudo da atividade sedativa e ansiolítica

3.4.2.1 Campo Aberto

O aparelho do campo aberto consiste em uma superfície demarcada com círculos e circundada por um cilindro de acrílico com 28 cm de diâmetro e 30 cm de altura. A superfície é dividida em doze campos com linhas pintadas de preto (Figura 4). É um experimento para avaliar a atividade motora geral, comportamento exploratório e alguns comportamentos associados à ansiedade (KUMAR; BHAT; KUMAR, 2014).

Os animais foram colocados no meio do equipamento e observados durante 5 minutos os seguintes parâmetros: a) ambulação central (frequência de entrada com as quatro patas nos quadrantes centrais do equipamento); b) ambulação periférica (frequência de entrada com as quatro patas na periferia do equipamento); c) número de levantamentos (rearing - quando o animal se apoia apenas com as duas patas traseiras sem encostar na parede do aparelho); d) tempo de alto limpeza (grooming - tempo que o animal passa lambendo sua pele, rosto ou genitália); e) tempo de imobilidade; f) número de bolos fecais.

Após 30 dias de tratamento por via oral (gavagem) os animais foram submetidos ao campo aberto para avaliação comportamental.

Figura 4. Aparelho do Campo Aberto.



Fonte. INSIGHT-BRASIL.

3.4.2.2 Rota Rod

O teste Rota Rod representa junto ao campo aberto a principal abordagem geral de caracterização comportamental em modelos animais. Esta técnica permite detectar prejuízos como: ataxia, sedação e hiperexcitabilidade. O equipamento utilizado foi o EFF 412 *rota-rod* para camundongos (Insight-Brasil, Figura 5), o qual mede atividade motora, demonstrando alterações de equilíbrio e coordenação em animais de laboratório. Após 30 dias de tratamento, com óleo de Krill por via oral (gavagem), os animais foram colocados com as quatro patas sobre uma barra giratória não escorregadia, com 2,5 cm de diâmetro, elevado a 25 cm do piso, nas rotações de 15 e 30 rotações por minuto (rpm). Para cada animal registrou-se o tempo de permanência na barra em um período de até 2 (dois) minutos (DUNHAM; MIYA, 1957).

Figura 5. Aparelho Rota Rod.



Fonte. INSIGHT-BRASIL

3.4.2.3 Teste do Labirinto em Cruz Elevado

O Labirinto em Cruz Elevado (LCE) é baseado no modelo proposto por Pellow et al. (1985), para ratos e validado por Lister (1987) para camundongos e consiste de um aparelho com dois braços abertos opostos e dois fechados, também opostos, em forma de cruz grega. O teste de labirinto em cruz elevado corresponde a um importante instrumento de pesquisa para estudos de comportamentos relacionados à ansiedade, bastante utilizado na descoberta de novos fármacos. Neste teste ocorre o chamado evento de conflito de aproximação-esquiva do animal,

avaliado em ambiente desconhecido, somado a tendência natural de esquiva em relação às regiões abertas, potencialmente perigosas e conflituosas (PINTO et al., 2011) (Figura 6).

As principais medidas comportamentais registradas no LCE compreendem: frequência de entrada nos braços abertos, frequência de entrada nos braços fechados, tempo de permanência nos braços abertos, tempo de permanência nos braços fechados.

Figura 6. Labirinto em Cruz Elevado.

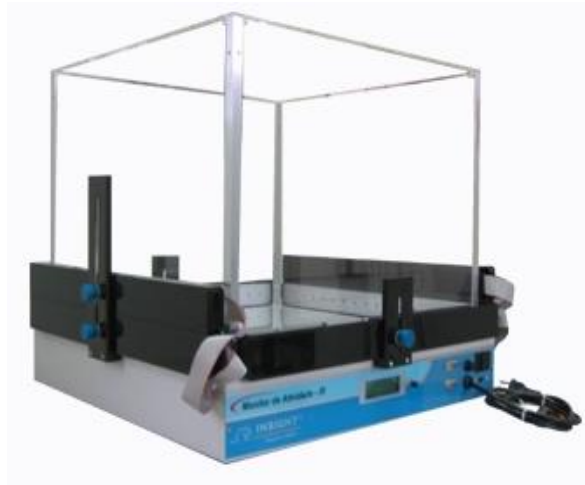


Fonte. INSIGHT-BRASIL.

3.4.2.4 Monitor de Atividade

O Monitor de Atividade (Figura 7) é um equipamento cuja finalidade é a monitoração de movimentos em roedores colocados dentro de uma arena cúbica. Os movimentos são monitorados nos eixos x, y e z, ou seja, altura, largura e profundidade. O programa reconhece movimentos circulares, horário e anti-horário, bem como caminhadas, com a possibilidade de ser medido o espaço percorrido e o tempo. Parâmetros avaliados pelo programa neste estudo foram: distância percorrida, tempo de movimentação e velocidade da movimentação, gerando uma planilha de dados em formato txt e excel (OLIVEIRA et al. 2009).

Figura 7. Aparelho Monitor de Atividade.



Fonte. INSIGHT-BRASIL.

3.5 EUTANÁSIA

Após o período experimental, os camundongos foram pré-anestesiados com acepromazina (3 mg/kg) e, em seguida, anestesiados com uma mistura de cloridrato de cetamina (250 mg/kg), por via intramuscular, e cloridrato de xilazina (10 mg/kg) por via intraperitoneal, em dose suficiente para eliminar o reflexo corneal (CONCEIÇÃO-SILVA; PRESGRAVE, 2008).

Após a ausência do reflexo corneal, administrou-se 1-2 mL/kg de cloreto de potássio e os camundongos foram eutanasiados por deslocamento cervical (DAMY et al., 2010). Todos os procedimentos desde o início do estudo até o momento de eutanásia foram realizados para evitar o sofrimento, reduzir o desconforto e dor dos animais.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram avaliados utilizando o programa estatístico Graph Pad Prism versão 6.1. Os testes de hipótese foram definidos de acordo com a normalidade dos dados, após teste de D'Agostino & Pearson, bem como a classificação das variáveis, sendo utilizado Teste T-Student, Teste de Mann-Whitney e Exato de Fisher.

Os dados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (e.p.m.). Os resultados foram considerados significativos quando obtido um nível de significância menor que 5% ($p < 0,05$).

REFERÊNCIAS

- BARROS, P. M.; POPPE, C. S.; BONDAN, E. F. Neuroprotective Properties of the Marine Carotenoid Astaxanthin and Omega-3 Fatty Acids, and Perspectives for the Natural Combination of Both in Krill Oil. **Nutrients**, v.6, p. 1293-1317, 2014.
- BONDI, C. O. et al. Adolescent behavior dopamine availability are uniquely sensitive to dietary omega-3 fatty acid deficiency. **Biological Psychiatry**, v.75, n.1, p. 38-46, 2014.
- BORGES, M. A. et al. Urban prevalence of epilepsy: population study in São José do Rio Preto, a medium-sized city in Brazil. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 62, n. 2, p. 199-205, 2004.
- BRASIL. Ministério da Saúde - Secretaria de Atenção à Saúde. **Portaria SAS-MS** n. 492 de 23 de setembro de 2010. Aprova o protocolo clínico e diretrizes terapêuticas – epilepsia. 2010.
- BUNEA, R.; EL FARRAH, K.; DEUTSCH, L. Evaluation of the effects of neptune krill oil on the clinical course of hyperlipidemia. **Alternative Medicine Review**, v.9, p.420-8, 2004.
- CALVANO, L. A. et al. Epidemiologia das Epilepsias na População da Cidade de Maceió-Alagoas. **Neurobiologia**, v. 73, n. 1, p. 55-62, 2010.
- CAMPÊLO, L. M. L. et al. Avaliação do potencial neuroprotetor do óleo essencial de *citrus limon* em hipocampo e corpo estriado de camundongos após convulsões induzidas pela pilocarpina. **Boletim Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v.10, n. 2, p.116-126, 2011.
- CHANG, C.Y.; KE, D. S.; CHEN, J. Y. Essential fatty acids and human brain. **Acta Neurologica Taiwanica**, v. 18, n. 4, p. 231–41, 2009.
- CHAVES-CARBALLO, E. Dietas médicas en el tratamiento de las enfermedades neuropediátricas. **Revista Neurologia**, v. 37, p. 267-74, 2003.
- CONCEIÇÃO-SILVA, F.; PRESGRAVE, O. A. F. Fármacos usados em animais de laboratório anestésicos e analgésicos. In:NETO FARIA, H. C. C.; SANTOS, B. F. **Manual de utilização de animais/Fiocruz**. Rio de Janeiro: 2008. p. 20-27.
- COSTA, I. et al. Terapia nutricional em doenças neurológicas: Revisão de literatura. **Revista de Neurociência**, v. 18, n. 4, p. 555-560, 2010.
- DAMY, S. B. et al. Aspectos fundamentais da experimentação animal – aplicações em cirurgia experimental. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 56, n. 1, p. 103-111, 2010.
- DE OLIVEIRA L, et al.. Different sub-anesthetic doses of ketamine increase oxidative stress in the brain of rats. **Progress in Neuro-psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 33, n. 6, p. 1003-08, 2009.

- DE SOUSA, D. P., et al. Evaluation of the anticonvulsant activity of terpinen-4-ol. **Naturforsch**, v. 64, p. 1-4, 2009.
- DUNHAM N. W., MIYA T. S. A note in simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. **Journal of the American Pharmacists Association**, v. 46, p. 208-209, 1957.
- ENGEL, J. Report of the ILAE Classification Core Group. **Epilepsia**, v. 47, n. 9, p. 1558-1568, 2006.
- ERBGUTH, F.; HIMMERICH, H. Nutrition and dietary supplements in neurological diseases. **Journal Article**, v. 85, n. 12, p. 1501-1511, 2014.
- FONTENELLE, L. Neurologia em adolescentes. **Jornal de Pediatria**, v. 77, n.2, p. 205-216, 2001.
- GIGLIOTTI, J. C. et al. Extraction and characterisation of lipids from Antarctic krill (*Euphausia superba*). **Food Chemistry**, v. 125, n. 3, p. 1028-1036, 2011.
- GUIMARÃES, M. A.; MÁZARO, R. **Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação**. São Paulo: UNIFESP – Universidade Federal de São Paulo, 2004. 167 p.
- HUTTENLOCHER, P. R. Ketonemia and seizures: metabolic and anticonvulsant effects of two ketogenic diets in childhood epilepsy. **Pediatric Research**, v.10, p. 536-540, 1976.
- KINSMAN, S. L. et al. Efficacy of the ketogenic diet for intractable seizure disorders: review of 58 cases. **Epilepsia**, v. 33, p. 1132-6, 1992.
- KONAGAI, C. et al. Effects of krill oil containing n-3 polyunsaturated fatty acids in phospholipid form on human brain function: a randomized controlled trial in healthy elderly volunteers. **Clinical Interventions in Aging**, v. 8, p. 1247-1257, 2013.
- KUMAR V.; BHAT, Z. A.; KUMAR, D. Animal models of anxiety a comprehensive review. **Journal Pharmacological Toxicological Methods**, v. 68, n.2, p. 175-183, 2014.
- LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, p. 92180-185, 1987.
- LIVINGSTON, S.; PAULI, L. L.; PRUCE, I. Ketogenic diet in the treatment of childhood epilepsy. **Development Medicine & Child Neurology**, v.19, p. 19:833-4, 1977.
- LOSCHER, W.; SCHMIDT, D. Which animal models should be used in the search for new antiepileptic drugs. A proposal based on experimental and clinical considerations. **Epilepsy Research**, v. 2, n. 3, p. 145-81, 1988.
- MARANHÃO, V. M.; GOMES, E. A.; CARVALHO, P. E. Epilepsia e Anestesia. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 61, n. 2, p. 232-254, 2011.

MARKI, K.C., et al. Krill oil supplementation increases plasma concentrations of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in overweight and obese men and women. **Nutrition Research**, v.29, p. 609-615, 2009.

MARQUES, T. H. C. et al. Anticonvulsant effects of acute treatment with cyane-carvone at repeated oral doses in epilepsy models. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 124, p. 421-424, 2014.

MARZON, V. D. et al. Dietary krill oil increases docosahexaenoic acid and reduces 2-arachidonoylglycerol but not N-acylethanolamine levels in the brain of obese Zucker rats. **International Dairy Journal**, v. 20, n.4, p. 231-235, 2010.

MERRITT, H. H.; PUTNAM, T. J. Landmark article Sept 17, 1938: Sodium diphenyl hydantoinate in the treatment of convulsive disorders. By H. Houston Merritt and Tracy J. Putnam. **The Journal of the American Medical Association**, 251, 1062-7, 1984.

MERUSSE, J. L. B.; LAPICHICK, V. B. V. Instalações e equipamentos. In: LUCA, R. R. et al. Eds. **Manual para técnicos em bioterismo**. 2.ed. São Paulo: Comissão de Ensino do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, cap. 3, p. 15-25, 1996.

MULDOON, M. F. et al. Serum phospholipid docosahexaenoic acid is associated with cognitive functioning during middle adulthood. **Journal of Nutrition**, v.140, p. 848-853, 2010.

NEJM M. B. et al. Fish oil provides protection against the oxidative stress in pilocarpine model of epilepsy. **Metabolic Brain Disease**, v. 4, n. 30, p. 903-909, 2015.

NETO, J. G.; MARCHETTI, R. L. Aspectos epidemiológicos e relevância dos transtornos mentais associados à epilepsia. **Revista Brasileira de Psiquiatria**. v. 4, n. 27, p. 323-328, 2005.

PABLOS-SÁNCHEZ, T. et al. Experiencia en el tratamiento con dieta cetogénica de la epilepsia refractaria en la edad pediátrica. **Revista de Neurologia**. v.58, p. 55-62, 2014.

PARIS, M. K. Omega-3 DHA and EPA for Cognition, Behavior, and Mood: Clinical Findings and Structural-Functional Synergies with Cell Membrane **Phospholipids**, v. 12, n. 3, p. 207-227, 2007.

PARK, H. et al. Enhanced learning and memory of normal young rats by repeated oral administration of Krill Phosphatidylserine. **Nutritional Neuroscience**, v.16, n. 2, p. 47-53, 2013.

PARMET, S.; LYNM, C.; GOLUB, R. M. Epilepsy. **The Journal of the American Medical Association**, v. 305, n.16, 2011.

PELLOW, S. et al. Validation of open: Closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, n. 3, p. 14149-167, 1985.

QUINTANS-JÚNIOR, L. J. et al. Anticonvulsant evaluation of Rauvolfia ligustrina Willd. ex Roem. e Schult., Apocynaceae, in rodents. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, n.20, v.1, p.54-59, 2010.

RACINE, R. J. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. **Electroencephalography and Clinical Neurophysiology**, v. 32, n 3, p 281-94, 1972.

RANG, H. P. et al. **Farmacologia**. 6.ed.Rio de Janeiro: Ed. Elsevier, 2007.

SANDER, J.W.; SHORVON, S. D. Epidemiology of the epilepsies. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v.61, n. 5, P.433-443, 1996.

SCOTT, R. A.; LHATOO, S. D.; SANDER, J. W. The treatment of epilepsy in developing countries: where do we go from here? **Bulletin World Health Organization**, v. 79, n.4, p.344-351, 2001.

SIERRA, S. et al. Administration of docosahexaenoic acid before birth and until aging decreases kainate-induced seizures in adult zebrafish. **Brain Research Bulletin**, v. 88, n. 5, p. 467-70, 2012.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia: I Diretriz sobre consumo de gorduras e saúde cardiovascular**. v. 100, n. 3, 2013.

SWINYARD, E.A.; BROWN, W.C.; GOODMAN, L.S. Comparative assays of antiepileptic drugs in mice and rats. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 106, n.3, p. 319-30, 1952.

SWINK, T. D.; VINING, E. P. G.; FREEMAN, J. M. The ketogenic diet: 1997. **Advances Pediatrics**, v. 44, p. 297-329, 1997.

PLACENCIA M. et al. Epileptic seizures in an Andean region of Ecuador. Incidence and prevalence and regional variation. **Brain**, v.115, n.3, p. 771-782, 1992.

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

VASCONCELOS, M. M. et al. Efficacy and toxicity of the ketogenic diet in children with intractable epilepsy. **Annals of Neurology**, v.3: n.505, 1995. [abstract].

VINING, E. P. G. The ketogenic diet. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 497, p. 225-31, 2002.

VINING, E. P. G. et al. A multicenter study of the efficacy of the ketogenic diet. **Archives of Neurology**, v. 55, p. 1433-7, 1998.

WIBRAND, K. et al. Enhanced cognitive function and antidepressant-like effects after krill oil supplementation in rats. **Lipids in Health and Disease**, v. 12, n. 6, p. 2-13, 2013.

WITHROW, C. D. Antiepileptic Drugs. **The Ketogenic diet: mechanism of anticonvulsant action.** In Glaser GH, Penry JK, Woodbury DM, Antiepileptic drugs: mechanisms of action. New York: Raven Press; 1980. p. 635-42.

ZIMMER, I. et al. Chronic n-3 polyunsaturated fatty acid diet-deficiency acts on dopamine metabolism in the rat frontal cortex: a microdialysis study. **Neuroscience Letters**, v. 240, p. 177–181, 1998.

APÊNDICE

APÊNDICE

ARTIGO

**SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE KRILL ATENUA CONVULSÕES EM
CAMUNDONGOS INDUZIDAS POR ELETRO-CHOQUE E
PENTILENOTETRAZOL**

Periódico: Lipids

ISSN: 0024-4201

Fator de impacto: 1.854

Qualis: B1 para Área de Nutrição

(ANO-BASE 2013)

SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE KRILL ATENUA CONVULSÕES EM CAMUNDONGOS INDUZIDAS POR ELETRO-CHOQUE E PENTILENOTETRAZOL

Roberta de Araujo Gouveia, Mestrado ^{a,b}; Claudenise Caldas da Silva Dantas, Doutorado^c; Camyla Rocha de Carvalho Guedine, Doutorado^b; Géssica Almeida de Freitas, Graduada^d; Sandy Ferreira Martins, Graduado^e; Camila de Castro Barbosa, Graduada^f; Maria da Conceição Rodrigues Gonçalves^b, Doutorado, Temilce Simões de Assis, Doutorado^c; Liana Clébia de Morais Pordeus, Doutorado^b

^a Autor Correspondente: roberta-nut@hotmail.com

Avenida Bahia 900, apt. 1402, Bairro dos Estados

^b Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil

^c Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Drogas da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil

^d Graduanda em Psicologia-PIBIC- pela Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil

^e Graduando em Nutrição pela Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil

^f Graduada em Biotecnologia e Bioprocessos pela Universidade Federal da Paraíba, Sumé, Brasil

Destaques

- O óleo de krill possuiu efeito anticonvulsivante no eletro-choque
- O óleo de krill possuiu efeito anticonvulsivante no teste Pentilenotetrazol (PTZ)
- Sugere-se realização de mais estudos para identificar os mecanismos de ação

Resumo

A epilepsia é uma doença caracterizada por transtornos neurológicos de longa duração, onde o episódio mais grave dessa patologia está associado a crises de convulsão. A ciência vem buscando novos fármacos, assim como tratamentos não convencionais para fornecer qualidade de vida aos indivíduos acometidos por essa doença. Há evidências científicas de uma associação entre o conteúdo de ácidos graxos da dieta e mudanças específicas no sistema de neurotransmissão, com destaque para os ácidos graxos poliinsaturados, que são capazes de alterar a excitabilidade neuronal, agirem como neuroprotetores, além de possuírem ação anticonvulsivante. O presente estudo teve como objetivo investigar os possíveis efeitos anticonvulsivantes do óleo de krill no sistema nervoso central de camundongos. Foram utilizados 60 camundongos Swiss machos, divididos em Grupo Controle (GC) que recebeu água destilada e Grupo Krill (GK) que recebeu o óleo de krill, ambos por gavagem sendo a quantidade administrada 1mL/100g de peso do animal/dia, durante 30 dias. As alterações comportamentais foram analisadas no 31º dia por meio dos experimentos: pilocarpina, eletro-choque e pentilenotetrazol. No teste do eletro-choque o grupo submetido à suplementação com óleo de krill apresentou um menor tempo de convulsão quando comparado ao grupo controle. No teste pentilenotetrazol (PTZ) o GK obteve uma maior latência para o aparecimento da primeira convulsão, além da diminuição das convulsões tônicas e tônico-clônicas quando comparado ao GC. Não foi observado resultado significativo para o teste de pilocarpina. Diante do exposto o óleo de krill é um possível candidato ao tratamento coadjuvante da convulsão.

Palavras-chave: Lipídios, óleo de krill, convulsão.

1 Introdução

O Sistema Nervoso Central (SNC) é o segundo órgão com maior conteúdo de lipídios do corpo humano, perdendo apenas para o tecido adiposo, com o equivalente a 60% de conteúdo lipídico¹. Sendo assim, os ácidos graxos estão entre as moléculas mais importantes que determinam a integridade e o desenvolvimento do cérebro².

Há evidências científicas de uma associação entre o conteúdo de ácidos graxos da dieta e mudanças específicas no sistema de neurotransmissão no cérebro de ratos, com destaque para os ácidos graxos poliinsaturados. Os ácidos graxos poliinsaturados alteram a excitabilidade neuronal e são neuroprotetores, além de possuírem ação anticonvulsivante³. Dentre os benefícios desses ácidos graxos temos a melhora da função cognitiva, com aumento da capacidade de aprendizado e memória⁴.

O óleo de krill é um nutracêutico, obtido de um tipo de crustáceo (*Euphausia superba*), rico em ácidos graxos poliinsaturados, além de ser uma excelente fonte de ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA)⁵. Uma das vantagens desse composto, é que ele é armazenado na forma de fosfolipídio, compondo a membrana celular, exercendo uma função estrutural, não sendo apenas armazenado como forma de triglicerídeos⁶. E em relação ao sistema nervoso central, esse composto melhorou a resposta cognitiva, o aprendizado, além de minimizar distúrbios neurológicos⁷. Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo investigar os possíveis efeitos anticonvulsivantes do óleo de krill no SNC de camundongos.

2 Materiais e Métodos

2.1 Material para análise

O óleo de krill utilizado no estudo foi obtido através de cápsulas gelatinosas adquiridas em loja especializada em produtos nutricionais, cada cápsula continha 1 mL desse óleo e foram armazenadas na embalagem do fabricante, seguindo as instruções de armazenamento do mesmo até o início dos testes.

2.2 Animais e Tratamento

O estudo foi permitido pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro de Biotecnologia da UFPB e protocolado sob o número 0311/14. Foram usados camundongos swiss, albinos, machos, com aproximadamente 30 dias e com peso corporal entre 31g e 49g, mantidos a temperatura constante ($21 \pm 1^\circ\text{C}$), ciclo claro e escuro de 12 horas cada, sendo a fase clara de 06:00 às 18:00 horas, de acordo com os padrões recomendados para roedores⁸.

Os animais foram alimentados com ração balanceada e água filtrada *ad libitum*. Foram divididos em Grupo Controle (GC) que recebeu água destilada e Grupo Krill (GK) tratado com óleo de krill, ambos com n=10 para cada experimento. Cada grupo de animais recebeu por gavagem 1 mL/100g de peso do animal/dia⁹, ambos durante 30 dias. Para cada teste comportamental foram utilizados diferentes grupos de animais, submetidos à avaliação 24 horas após o último dia de tratamento.

2.3 Testes Experimentais

Nos testes das convulsões induzidas pelo eletro-choque auricular os animais foram submetidos a estímulo elétrico aplicado através de eletrodos com cliques auriculares (ECT UNIT 7801, Ugo Basile) nos camundongos e os mesmos foram observados por no máximo 5 segundos (130 V, 150 Hz, 0,5 s)¹⁰. Os parâmetros avaliados foram: a) percentagem de animais que apresentavam convulsão; b) duração da convulsão (tempo de flexão e extensão das patas posteriores) e c) número de mortes.

No teste de convulsão induzida pelo PTZ, os animais receberam injeção de 60 mg/kg de PTZ (solúvel em água destilada) por via intraperitoneal (i.p) e foram colocados individualmente em caixas de polietileno e observados durante 15 minutos para verificação dos seguintes parâmetros: a) presença de crises convulsivas; b) período de latência (tempo decorrido desde a administração do PTZ até o aparecimento da primeira convulsão); c) duração da crise máxima e d) percentual de mortes^{11,12}.

No teste de convulsão induzida pela pilocarpina os animais receberam pilocarpina na dose de 400 mg/kg por via i.p. Após os tratamentos os grupos foram avaliados de acordo com a classificação da crise epiléptica por gravidade conforme a escala de Racine¹³.

2.4 Eutanásia

Após o período experimental, os camundongos foram pré-anestesiados com acepromazina (3mg/kg), e anestesiados com uma mistura de cloridrato de cetamina (250 mg/kg) por via intramuscular e cloridrato de xilazina (10 mg/kg) por via i.p., em dose suficiente para eliminar o reflexo corneal¹⁴. Após a ausência do reflexo corneal, administrou-se 1-2 mmol/kg de cloreto de potássio e os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical¹⁵.

2.5 Estatística

Os dados foram avaliados utilizando o programa estatístico Graph Pad Prism versão 6.1. Os testes de hipótese foram definidos de acordo com a normalidade dos dados, após teste de D'Agostino & Pearson, bem como a classificação das variáveis, sendo utilizado Teste T-Student, Teste de Mann-Whitney e Exato de Fisher.

Os dados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (e.p.m.). Os resultados foram considerados significativos quando obtido um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

3 Resultados

Para o teste das convulsões induzidas pelo eletro-choque auricular os animais tratados com óleo de krill tiveram 70% de convulsões tônico-clônicas enquanto que os do grupo controle apresentaram 30%, sendo $p < 0,0001$ (**Fig. 1**). Com relação às convulsões tônicas os animais do grupo controle tiveram mais convulsões (80%), estatisticamente significativas com $p < 0,0001$, que os suplementados com o óleo de krill (20%) (**Fig. 2**). Em relação ao tempo que os animais permaneciam tendo convulsões, observou-se que o grupo submetido à suplementação com óleo apresentou um menor tempo ($23,8 \pm 2,6s$), quando comparado ao grupo controle ($33,2 \pm 3,7s$) $p = 0,03$ (**Fig. 3**).

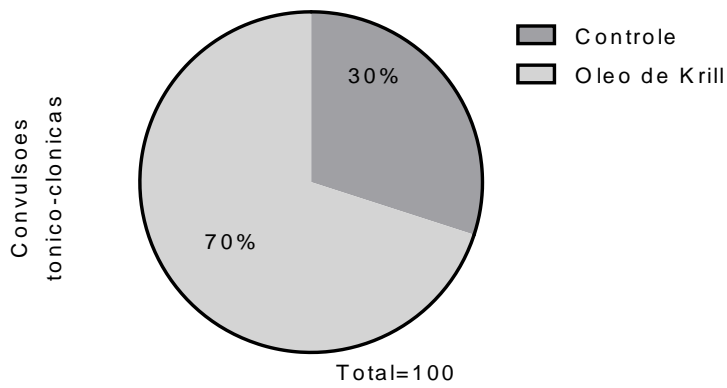


Fig. 1. Efeito do óleo de krill sobre o número de convulsões tônico-clônicas em camundongos submetidos ao teste do eletro-choque durante 5 minutos. Os valores estão expressos em média \pm e.p.m, n=10, *p < 0,05 quando comparado com o GC. Teste T-Student.

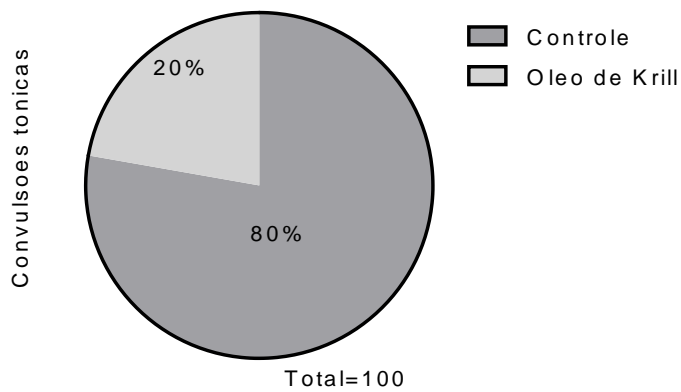


Fig. 2. Efeito do óleo de krill sobre o número de convulsões tônicas em camundongos submetidos ao teste do eletro-choque durante 5 minutos. Os valores estão expressos em média \pm e.p.m, n=10, *p < 0,05 quando comparado com o GC. Teste T-Student.

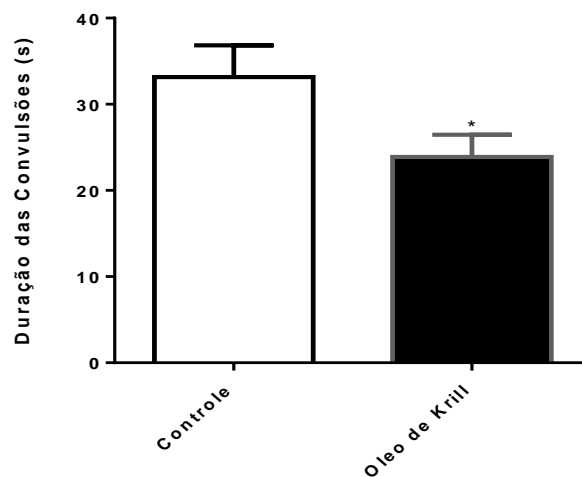


Fig. 3. Efeito do óleo de krill sobre o tempo de convulsão em camundongos submetidos ao teste do eletro-choque durante 5 minutos. Os valores estão expressos em média \pm e.p.m, $n=10$, $*p < 0,05$ quando comparado com o GC. Teste T-Student.

Para o teste das convulsões induzidas pelo PTZ a latência para o aparecimento da primeira convulsão, dos animais do GC foi de $104,7 \pm 18,14$ s e do GK foi de $211,8 \pm 33,83$ s, sendo uma diferença significativa, $p < 0,05$ (**Fig. 4**).

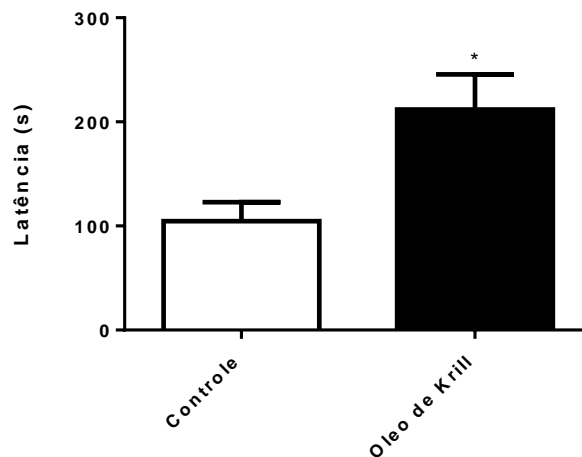


Fig. 4. Efeito do óleo de krill sobre a latência para o aparecimento da primeira convulsão no teste das convulsões induzidas pelo pentilenotetrazol. Os dados estão expressos em média \pm e.p.m, $n=10$ $*p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle. Teste T-Student.

No tocante ao número de convulsões clônicas foram observadas diferenças significativas. Para o grupo controle calculou-se uma média de $3,89 \pm 0,8$ abalos e para o grupo experimental de $1,37 \pm 0,5$ abalos, $p < 0,05$. Para as convulsões tônico-clônicas, também foram observadas diferenças significativas com número médio de convulsões de $1,67 \pm 0,3$ para o GC e $0,44 \pm 0,2$ para o GK, $p < 0,05$ (**Fig. 5**).

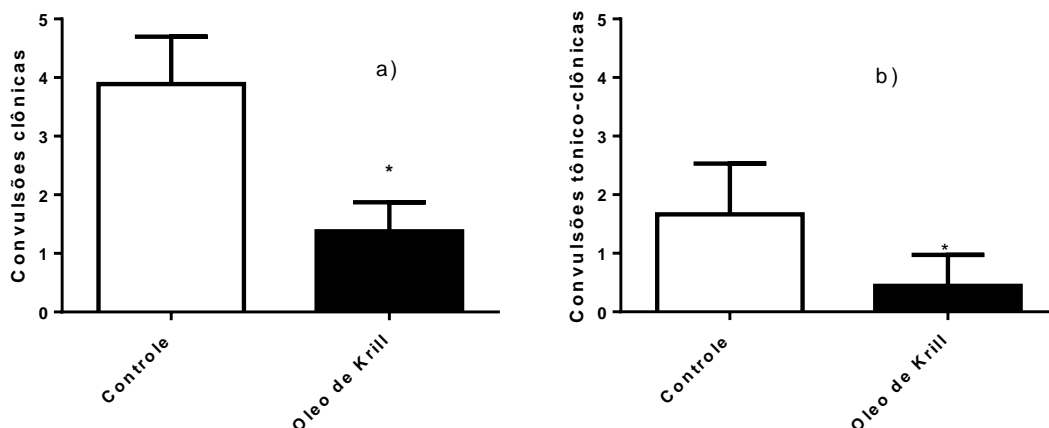


Fig. 5. Efeito do óleo de krill sobre o número de convulsões a) clônicas e b) tônico-clônicas no teste das convulsões induzidas pelo Pentilenotetrazol. Os valores estão expressos em media \pm e.p.m, n=10 *p<0.05 quando comparado ao grupo controle. Teste T-Student.

No teste da pilocarpina para avaliação da atividade anticonvulsivante o óleo de krill não interferiu em nenhum dos parâmetros observados, tais como: latência para a primeira convulsão, lacrimejamento, movimentos orofaciais, bem como o tempo total de convulsão.

4 Discussão

Neste estudo, a atividade anticonvulsivante foi avaliada pela observação da presença ou não de convulsões induzidas por eletro-choque (método físico) ou por agentes estimulantes centrais (método químico), a exemplo do PTZ ao ser administrado o óleo de krill por 30 dias em camundongos. O teste de convulsão induzido pelo eletro-choque auricular segundo Merrit e Putman¹⁶, consiste basicamente na estimulação por meio de pulsos elétricos repetitivos da atividade epiléptica, em que o eletro-choque induz a extensão tônica dos membros inferiores. O PTZ induz as convulsões por atuar bloqueando os canais de cloreto associados aos receptores de GABA¹⁷. Azanchi, Shafaroodi e Asgarpanah¹⁸ avaliaram por meio de testes *in vivo* o efeito da atividade anticonvulsivante do óleo essencial de flores *Citrus aurantium* L., cujas metodologias utilizadas para avaliação foram PTZ e eletro-choque. O estudo concluiu que esse óleo essencial apresenta possível efeito anticonvulsivante, pois apesar de diminuir a latência de convulsão clônica no PTZ, causou inibição da convulsão tônica, além de diminuir a taxa de mortalidade no eletro-choque. Um levantamento bibliográfico realizado por De Almeida, Motta e Leite¹⁹ lista diversos óleos essenciais vegetais, como óleos de *Pimpinella anisum* L., *Psidium guayanensis*, *Psidium pohlianum*, *Tetrapleura tetraptera*, os quais apresentaram efeito anticonvulsivante em testes *in vivo* induzidos por eletrochoque e por PTZ.

O óleo de krill é proveniente de um tipo de crustáceo (*Euphausia superba*) encontrado nas águas frias da Antártida. O mesmo possui na sua constituição o ômega-3, na forma de ácido eicosapentaenoico (EPA) e ácido docosaexaenoico (DHA) e estes tem demonstrado uma relação estreita na função cognitiva, melhora na resposta de aprendizagem, além de revelar potencial efeito antidepressivo, minimizando distúrbios neurológicos^{20,7}.

A busca de substâncias bioativas, como alimento funcional, vem crescendo e dentro desse contexto, o óleo de krill encapsulado tem conquistado o mercado de nutracêuticos por revelar vários benefícios à saúde, como recuperação da homeostase do perfil lipídico, alternativa promissora na redução do fator de risco para doenças cardiovasculares, assim como efeito positivo na resposta cognitiva²¹.

Um estudo clínico, caso-controle, realizado com 70 crianças com epilepsia resistentes ao tratamento convencional, das quais foram divididas em 2 grupos, onde 35 crianças receberam óleo de peixe e as outras 35 receberam um placebo para avaliação da frequência e gravidade dos ataques epilépticos. Esse estudo revelou que as crianças que receberam óleo de peixe apresentaram melhora significativa da severidade dos episódios de convulsões, sugerindo que o ômega-3 presente no óleo de peixe, ácidos graxos poliinsaturados na forma de EPA e DHA, elevou o limiar de convulsão nos pacientes epilépticos, promovendo auxílio no controle de crises²².

Pode-se sugerir que o óleo de krill, assim como óleo de peixe, pode ser considerado uma excelente alternativa para indivíduos resistentes aos tratamentos convencionais já que o óleo de

krill e óleo de peixe representam fontes comparáveis de ácidos graxos ômega-3 na forma de EPA e DHA. Porém o óleo de krill não é só armazenado na forma de triglicerídeos, mas também podem exercer função estrutural ao incorporar de 30 a 65% de fosfolipídios nas membranas neurais^{21,20}. Outro estudo realizado para avaliar a ação benéfica do óleo de peixe na convulsão, em roedores que foram suplementados de forma crônica desde a concepção embrionária até a idade adulta, com os episódios de convulsão sendo induzidos através da administração de 3-Ácido Mercaptopropiônico (MPA), concluiu que a suplementação crônica com ômega-3 de origem marinha pode ter propriedades anticonvulsivantes, pois os ratos machos tratados com óleo de peixe revelaram maior latência para o início das crises, com menos episódios convulsivos²³, em concordância com os resultados obtidos nos testes de eletro-choque realizados com óleo de krill, o qual diminuiu o tempo das convulsões tônicas. Diante do exposto o ômega-3 pode ser uma alternativa potencial no tratamento da epilepsia, assim reforçando a sua capacidade bioativa.

A suplementação com óleo de krill não foi capaz de reduzir os efeitos induzidos pela pilocarpina. Esta substância convulsivante é um agonista colinérgico utilizado em animais para mimetizar a fisiopatologia das convulsões, uma vez que promove lesões cerebrais em roedores²⁴.

Um estudo experimental em ratos submetidos à epilepsia do lobo temporal por pilocarpina revelou que a administração crônica de óleo de peixe imediatamente após o estado epilético, foi capaz de apresentar efeitos neuroprotetores e efeitos na neuroplasticidade. O estudo também constatou que o óleo de peixe é capaz de controlar as espécies reativas de oxigênio, as quais são aumentadas em animais com epilepsia⁷. Outro estudo *in vivo*, realizado por Manaa et al.²⁵ avaliou o efeito neuroprotetor do óleo de fígado de peixe e própolis em ratos epiléticos, através do teste da pilocarpina, sugerindo que quando administrados em combinação com fármaco anticonvulsivante apresenta propriedade neuroprotetora contra os distúrbios neurofisiológicos da epilepsia em ratos. Elwakkad, El Elshamy e Sibaii²⁶ também estudaram *in vivo* o óleo de fígado de peixe e própolis como produtos naturais de proteção contra os efeitos colaterais do valproato (droga anti-epiléptica), dentre eles a diminuição da massa óssea e o aumento de fraturas. Tendo como resultado, que essa suplementação foi capaz de aumentar os marcadores de formação óssea e diminuir a reabsorção própria. Noor et al.²⁷ avaliaram o efeito anti-epiléptico de curcumina e óleo de *Sativa Nigella* no modelo de pilocarpina de epilepsia no hipocampo e córtex de ratos em comparação com o valproato, fármaco convencional, sem evidenciar efeitos anticonvulsivantes. Porém, considerando que os efeitos de 400 mg/kg via i.p de pilocarpina é capaz de induzir alterações comportamentais severas, podendo levar a morte. Assim, a suplementação com a dose utilizada neste trabalho do óleo de krill, bem como a duração do tratamento pode ter sido insuficiente para a evidência de um efeito anticonvulsivante.

Os autores Marzon et al.²⁸ ao realizarem um estudo experimental com roedores, comparando o efeito do óleo de krill perante o efeito do óleo de peixe no perfil de ácidos graxos do cérebro, observaram que apenas o óleo de krill foi capaz de aumentar significativamente os níveis de DHA em fosfolipídios cerebrais. Em paralelo o estudo também revelou o efeito benéfico do óleo de krill no controle da síndrome metabólica em comparação ao óleo de peixe. Outro estudo realizado por Wibrand et al.²⁹ revelou que o óleo de krill, foi capaz de melhorar a resposta de aprendizagem, além de apresentar um potencial efeito antidepressivo. Em concordância, o estudo experimental realizado por Park et al.³⁰ revelou uma melhora na memória de ratos jovens, quando administrados óleo de krill por via oral de forma repetitiva.

Os efeitos benéficos do óleo de krill no SNC, bem como sua ação anticonvulsivante, observada nesse trabalho podem ser justificados pela sua contribuição significativa à síntese de fosfolípidios cerebrais. A análise dos resultados sugere que a suplementação com o óleo de krill por um período de 30 dias apresenta atividade anticonvulsivante, em modelos de epilepsia cujas convulsões são induzidas por estímulos elétricos, como no teste do eletro-choque, ou por bloqueio dos canais de cloreto associado aos receptores de GABA, como no teste do PTZ. Esses resultados geram subsídios para testes pré-clínicos onde o mecanismo de ação do óleo deverá ser investigado e a atividade anticonvulsivante confirmada, bem como validado o seu uso como tratamento coadjuvante na epilepsia.

REFERÊNCIAS

- [1] Taha AY, Burnham WM, Auvin S. Polyunsaturated fatty acids and epilepsy. *Epilepsia*. 2010; 51(8): 1348–58. doi: 10.1111/j.1528-1167.2010.02654.
- [2] Chang CY, Ke DS, Chen JY. Essential fatty acids and human brain. *Acta Neurologica Taiwanica*. 2009; 18(4): 231–41.
- [3] Sierra S, Alfaro JM, Sánchez S, Burgos JS. Administration of docosahexaenoic acid before birth and until aging decreases kainate-induced seizures in adult zebrafish. *Brain Research Bulletin*. 2012; 88(5): 467-70. doi: 10.1016/j.brainresbull.2012.04.007.
- [4] Muldoon MF, Ryan CM, Sheu L, Yao JK, Conklin SM, Manuck SB. Serum phospholipid docosahexaenoic acid is associated with cognitive functioning during middle adulthood. *Journal of Nutrition*. 2010; 140(4): 848-53. doi: 10.3945/jn.109.119578.
- [5] Maki KC, Reeves MS, Farmer M, Griinari M, Berge K, Vik H, et al. Krill oil supplementation increases plasma concentrations of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in overweight and obese men and women. *Nutrition Research*. 2009; 29(9): 609-615. doi: 10.1016/j.nutres.2009.09.004.
- [6] Konagai C, Yanagimoto K, Hayamizu K, Han L, Tsuji T, Koga Y. Effects of krill oil containing n-3 polyunsaturated fatty acids in phospholipid form on human brain function: a randomized controlled trial in healthy elderly volunteers. *Journal of Clinical Interventions in Aging*. 2013; 8:1247-57. doi: 10.2147/CIA.S50349.
- [7] Nejm MB, Haidar AA, Marques MJ, Hirata AE, Nogueira FN, Cavalheiro EA, et al. Fish oil provides protection against the oxidative stress in pilocarpine model of epilepsy. *Metabolic Brain Diseases*. 2015; 30 (4): 903-9. doi: 10.1007/s11011-015-9666-0.
- [8] Merusse JLB, Lapichick VB. Instalações e equipamentos. In: Luca RR, organizador. *Manual para técnicos em bioterismo*. 2.ed. São Paulo: Comissão de Ensino do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, 1996. p. 15-25.
- [9] Guimarães MA, Máزارo R. Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação. São Paulo: UNIFESP – Universidade Federal de São Paulo; 2004.
- [10] De Sousa DP, Nóbrega FF, De Moraes LC, De Almeida RN. Evaluation of the anticonvulsant activity of terpinen-4-ol. *Verlag der Zeitschrift fur Naturforschung C*. 2009; 64(1-2):1-5. doi: 10.1155/2014/703848.
- [11] Quintans-Júnior LJ, Siqueira JS, Melo MS, Silva DA, Moraes LCSL, Souza MFV, et al. Anticonvulsant evaluation of *Rauvolfia ligustrina* Willd. ex Roem. & Schult. doi: dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2010000100012.
- [12] Marques TH, Marques ML, Medeiros JV, Lima TC, De Souza DP, De Freitas RM. Anticonvulsant effects of acute treatment with cyane-carvone at repeated oral doses in epilepsy models. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2014; 124: 421-424. doi: 10.1016/j.pbb.2014.06.016.

- [13] Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*. 1972; 32 (3): 281-94.
- [14] Conceição-Silva F, Pregrave OAF. Fármacos usados em animais de laboratório anestésicos e analgésicos. In: Neto Faria HCC, Santos BF. *Manual de utilização de animais/Fiocruz*. Rio de Janeiro: 2008. p. 20-27.
- [15] Damy SB, Camargo RS, Chammas RM, Figueiredo LFP. Aspectos fundamentais da experimentação animal – aplicações em cirurgia experimental. *Revista da Associação Médica Brasileira*. 2010; 56(1):103-111. doi: dx.doi.org/10.1590/S0104-42302010000100024.
- [16] Merrit HH, Putnam TJ. Sodium diphenyl hydantoinate in the treatment of convulsive disorders. *Journal of the American Medical Association*. 1984; 111(12): 1068-73. doi: 10.1001/jama.1938.02790380010004.
- [17] Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*. 1972; 32 (3): 281-94.
- [18] Azanchi T, Shafaroodi H, Asgarpanah. Anticonvulsant activity of Citrus aurantium blossom essential oil (neroli): involvement of the GABAergic system. *Natural Product Communications*. 2014; 9(1): 1615-8. PMID:25532295.
- [19] De Almeida RN, Motta SC, Leite JR. Óleos essenciais com propriedades anticonvulsivantes. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 2003; 2(1): 3-6.
- [20] Berge K, Musa-Veloso K, Harwood M, Hoem N, Burri L. Krill oil supplementation lowers serum triglycerides without increasing low-density lipoprotein cholesterol in adults with borderline high or high triglyceride levels. *Nutrition Research*. 2014; 34(2): 126-133. doi: 10.1016/j.nutres.2013.12.003.
- [21] Gicliotti JC, Davenport MP, Beamer SK, Tou JC, Jacynski J. Extraction and characterisation of lipids from Antarctic krill (*Euphausia superba*). *Food Chemistry*. 2011; 125(3): 1028-1036. doi:10.1016/j.foodchem.2010.10.013.
- [22] Reda DM, Abd-El-Fatah NK, Omar Tel-S, Darwish OA. Fish Oil Intake and Seizure Control in Children with Medically Resistant Epilepsy. *North American Journal of Medical Sciences*. 2015; 7(7): 317-21. doi: 10.4103/1947-2714.161248.
- [23] Flores-Mancilla LE, Hernández-González M, Guevara MA, Benavides-Haro DE, Martínez-Arteaga P. Long-term fish oil supplementation attenuates seizure activity in the amygdala induced by 3-mercaptopropionic acid in adult male rats. *Epilepsy & Behavior*. 2014; 33: 126-34. doi: 10.1016/j.yebeh.2014.02.023.
- [24] Campêlo LML, Feitosa CM, Tomé AR, Freitas RM. Avaliação do potencial neuroprotetor do óleo essencial de *citrus limon* em hipocampo e corpo estriado de camundongos após convulsões induzidas pela pilocarpina. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 2011; 10(2): 116-26.
- [25] Manaa F, El-Shamy KA, El-Shaikh, El-Kassaby M. Efficacy of fisher liver oil and propolis as neuroprotective in pilocarpine epileptic rats treated with valproate. *Pathophysiology*. 2011; 18(4): 287-94. doi: 10.1016/j.pathophys.2011.04.002.
- [26] Elwakkad AS, El Elshamy KA, Sibaii H. Fish liver oil and propolis as protective natural products against the effect of the anti-epileptic drug valproate on immunological markers of bone formation in rats. *Epilepsy Research*. 2008; 80 (1): 47-56. doi: 10.1016/j.eplepsyres.2008.03.008.
- [27] Noor NA, Aboul Ezz HS, Faraag AR, Khadrawy YA. Evaluation of the antiepileptic effect of curcumin and Nigella sativa oil in the pilocarpine model of epilepsy in comparison with valproate. *Epilepsy & Behavior*. 2012; 24(2):199-206. doi: 10.1016/j.yebeh.2012.03.026
- [28] Marzo VD, Griinari M, Carta G, Murru E, Ligresti A, Cordeddu L, et al. Dietary krill oil increases docosahexaenoic acid and reduces 2-arachidonoylglycerol but not N-acylethanolamine levels in the brain of obese Zucker rats. *International Dairy Journal*. 2010; 20: 231-35. doi:10.1016/j.idairyj.2009.11.015.

[29] Wibrand K, Berge K, Messaoudi M, Duffaud A, Panja D, Bramham CR, et al. Enhanced cognitive function and antidepressant-like effects after krill oil supplementation in rats. *Lipids in Health Diseases*. 2013; 12(6). doi: 10.1186/1476-511X-12-6.

[30] Park HJ, Shim HS, Kim KS, Han JJ, Kim JS, Ram Yu A, et al. Enhanced learning and memory of normal young rats by repeated oral administration of Krill Phosphatidylserine. *Nutritional Neuroscience*. 2013; 16(2):47-53. doi: 10.1179/1476830512Y.0000000029.

OUTROS RESULTADOS

1-Avaliação da atividade sedativa e ansiolítica do óleo de krill

1.1.1 Efeito da suplementação do óleo de krill sobre a imobilidade de camundongos no teste utilizando o aparelho de campo aberto.

A suplementação com óleo de krill durante 30 dias por gavagem foi capaz de aumentar o tempo de imobilidade ($15,1 \pm 4,3$ s) em relação ao controle ($2,2 \pm 0,7$ s), sendo obtido um $p=0,0067$ no teste T-Student (Figura 1).

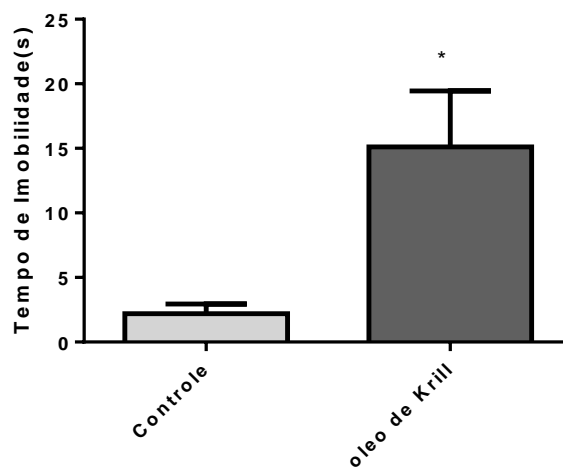


Figura 1. Efeito do óleo de krill sobre a imobilidade de camundongos machos submetidos ao teste do campo aberto durante 5 minutos. Os valores estão expressos em média \pm e.p.m, $n=10$, $*p < 0,05$, quando comparado com o GC. Teste T-Student.

No tocante a frequência de entrada nos quadrantes centrais, correspondente à ambulação central, o óleo de Krill reduziu esse parâmetro, sendo calculado uma mediana de 16 (8-20), enquanto que a mediana para o grupo controle foi de 20 (14-26), com $p=0,014$ no teste do Mann-Whitney (Figura 2).

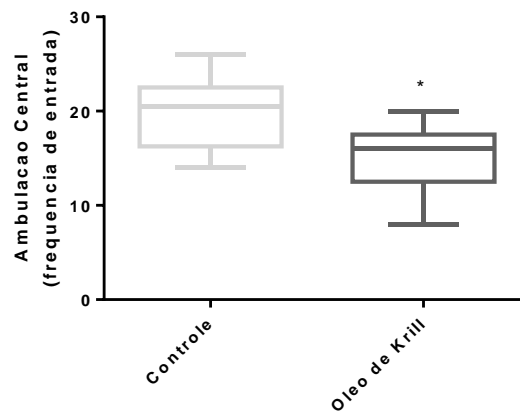


Figura 2. Efeito do óleo de krill sobre a ambulação central de camundongos machos submetidos ao teste do campo aberto durante 5 minutos. Os valores estão expressos em mediana (mínimo-máximo), $n=10$, $*p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle GC.

O óleo de krill também foi capaz de reduzir a ambulação periférica com mediana de 47 (27-63) quando comparado ao controle 68 (59-100), sendo $p=0,0003$ no Teste de Mann-Whitney (Figura 3).

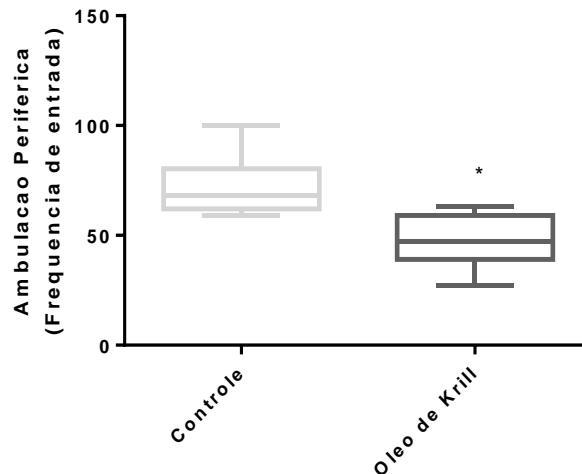


Figura 3. Efeito do óleo de krill sobre a ambulação periférica de camundongos machos submetidos ao teste do campo aberto durante 5 minutos. Os valores estão expressos em mediana (mínimo-máximo), $n=10$, $*p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle GC.

Em relação ao grooming (tempo de auto-limpeza), o óleo de krill aumentou o tempo ($26,3 \pm 3,3s$), quando comparado ao controle ($13,5 \pm 3,3s$), sendo $p < 0,01$ (Figura 4).

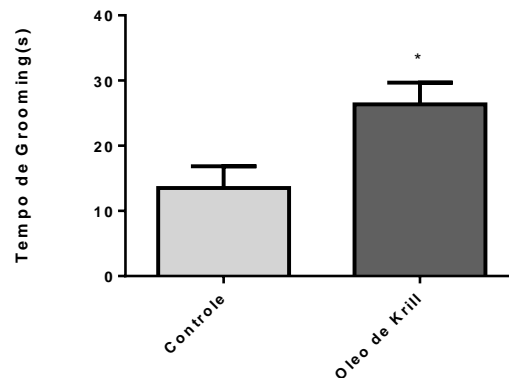


Figura 4. Efeito do óleo de krill sobre grooming (tempo de auto-limpeza) de camundongos machos submetidos ao teste do campo aberto durante 5 minutos. Os valores estão expressos em média \pm e.p.m, $n=10$, $p < 0,05$, quando comparado com o GC. Teste T-Student.

1.1.2 Efeito da suplementação do óleo de krill sobre o comportamento de camundongos no teste labirinto em cruz elevada

A análise dos resultados do número de entrada, tanto nos braços abertos quanto nos braços fechados do labirinto, bem como o tempo de permanência nos braços abertos, não demonstrou significância estatística no teste de Mann-Whitney. No que diz respeito ao tempo de permanência nos braços fechados, observou-se resultados significativos com $p=0,028$, cujos valores de média \pm e.p.m foram de $226,5 \pm 8,3$ segundos para o grupo suplementado com óleo de krill e $189,2 \pm 13,3$ segundos para o grupo controle (Figura 5).

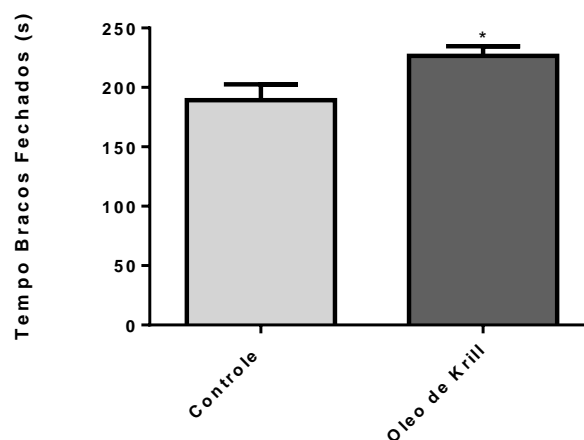


Figura 5. Efeito do óleo de krill sobre o teste de labirinto de cruz elevada em relação ao tempo de permanência em braços fechados. Os valores estão expressos em média \pm e.p.m, $n=10$, $*p < 0,05$ quando comparado com o GC. Teste T-Student.

1.1.3 Efeito da suplementação do óleo de krill sobre o comportamento exploratório de camundongos no teste utilizando o monitor de atividades.

Os animais tratados com óleo de krill percorreram uma menor distância ($226,1 \pm 18,5$ cm) quando comparado ao grupo controle ($282 \pm 17,8$ cm), cujo $p < 0,04$ (Figura 6).

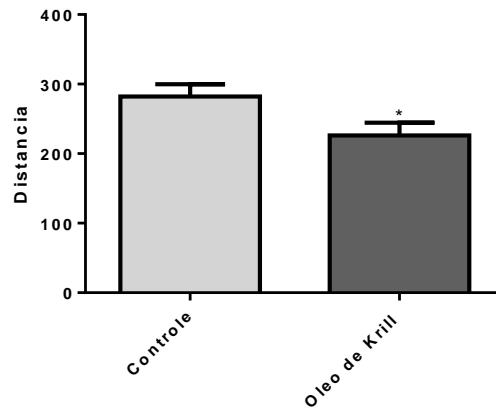


Figura 6. Efeito do óleo de krill sobre a distância (cm) percorrida por camundongos machos durante 5 minutos, no teste para avaliar a atividade locomotora. Os valores estão expressos em média \pm e.p.m, $n=10$, * $p < 0,05$ quando comparado com o GC. Teste T-Student.

Os animais tratados com óleo de krill se movimentaram em um tempo menor ($105,7 \pm 8,9$ s) que o grupo controle ($133,1 \pm 8,7$ s), cujo $p < 0,04$ (Figura 7).

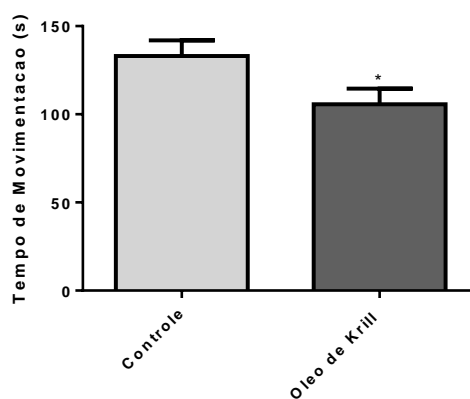


Figura 7. Efeito do óleo de krill sobre o tempo de movimentação (s) dos camundongos machos durante 5 minutos, no teste para avaliar a atividade locomotora. Os valores estão expressos em média \pm e.p.m, n=10, *p < 0,05 quando comparado com o GC. Teste T-Student.

A velocidade de movimentação dos animais tratados com óleo de krill foi menor ($2,2 \pm 0,24 \text{ m/s}^2$) que o grupo controle ($3,1 \pm 0,23 \text{ m/s}^2$) com $p < 0,01$ (Figura 8).

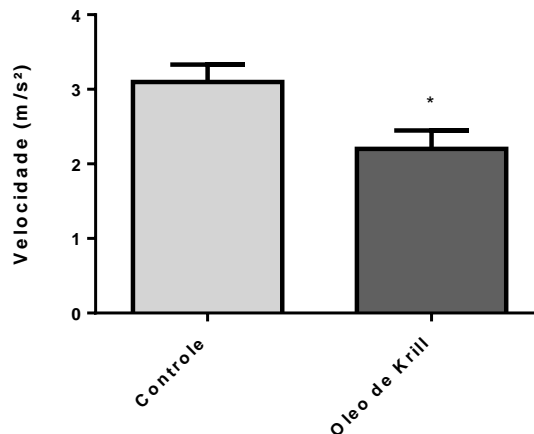


Figura 8. Efeito do óleo de krill sobre a velocidade de movimentação (m/s^2) dos camundongos machos durante 5 minutos, no teste para avaliar a atividade locomotora. Os valores estão expressos em média \pm e.p.m, n=10, $p < 0,05$ quando comparado com o GC. Teste T-Student.

1.1.4 Efeito da suplementação do óleo de krill sobre o comportamento de camundongos no teste de Rota-rod

Diferenças significativas não foram observadas entre o grupo experimental e o controle, no tocante ao tempo de permanência na barra giratória do aparelho de Rota-Rod.

ANEXO



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIDÃO



João Pessoa, 12 de dezembro de 2014

CEUA Nº 0311/14

Ilmo(a). **Prof(a)Dr(a)LIANA CLEBIA DE MORAIS PORDEUS**

Departamento **DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E PATOLOGIA - CCS - UFPB**

Orientando(a): **ROBERTA DE ARAÚJO GOUVEIA, (Mestrado)**

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba em sua reunião ordinária de **11/12/2014** analisou e **APROVOU** a execução do projeto **ESTUDO PRÉ-CLÍNICO DO EFEITO ANTICONVULSIVANTE DO ÓLEO DE KRILL EM CAMUNDONGOS.**

Com previsão de empregar **100 Camundongos SWISS Machos - ANIMAIS DO BIOTÉRIO Prof. Thomas George.**

Para serem utilizados no período de **10.01.2015 a 10.06.2015**

Atenciosamente,

Prof. Dr. Luis Cezar Rodrigues
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animal do CBIotec/UFPB