

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

DANIELLE VIANA DE SOUZA ALVES

**EFEITOS DO ÓLEO DE COCO E/OU DO AMBIENTE ENRIQUECIDO SOBRE A
EXCITABILIDADE CEREBRAL E A PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA EM RATOS
NUTRIDOS E HIPERNUTRIDOS DURANTE O ALEITAMENTO**

RECIFE – PE

2018

DANIELLE VIANA DE SOUZA ALVES

EFEITOS DO ÓLEO DE COCO E/OU DO AMBIENTE ENRIQUECIDO SOBRE A
EXCITABILIDADE CEREBRAL E A PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA EM RATOS
NUTRIDOS E HIPERNUTRIDOS DURANTE O ALEITAMENTO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de Mestre, na área de Bases Experimentais da Nutrição.

Orientadora: Profa. Dra. Ângela Amâncio dos Santos.

Recife, 2018

Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

52 f.: il.; tab.: 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Nutrição. Recife, 2018.

Inclui referências e anexos.

1. Óleo de coco. 2. Depressão alastrante da atividade elétrica cortical. 3. Hipernutrição. 4. Estresse oxidativo. 5. Rato. I. Santos, Ângela Amâncio dos (Orientadora). II. Título.

UFPE (CCS2018-110)

DANIELLE VIANA DE SOUZA ALVES

EFEITOS DO ÓLEO DE COCO E/OU DO AMBIENTE ENRIQUECIDO SOBRE A
EXCITABILIDADE CEREBRAL E A PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA EM RATOS
NUTRIDOS E HIPERNUTRIDOS DURANTE O ALEITAMENTO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nutrição – Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção de título de Mestre em Nutrição, área de concentração de Bases Experimentais da Nutrição.

Dissertação aprovada em 20 de fevereiro de 2018

Banca examinadora:

Elizabeth do Nascimento

Luciana Maria Silva de Seixas Maia

Matilde Cesiana da Silva

Dedico esse trabalho, ao meu esposo, Danniel Alves, por estar presente por inteiro,
com a sua parceria e amor, o que me faz sentir cada vez mais forte, diante de
qualquer desafio.

AGRADECIMENTOS

Um resultado de um trabalho, dificilmente é um fruto de um homem só. Nessa trajetória muitas pessoas especiais cruzaram meu caminho, e foi o que tornou possível a realização desse projeto.

O primeiro agradecimento, sempre será a Deus, força que guia a minha vida e me sustenta nesse mundo.

Agradeço aos meus pais, Socorro e Benedito, por serem essa referência tão importante na minha vida.

Aos meus filhos, Nicolas e Sofia, razão da minha vida, agradeço por ter me escolhido como mãe e de me dar à oportunidade a cada dia ser uma pessoa melhor, para tentar ensiná-los os verdadeiros valores humanos: amor, fé, honestidade, respeito, esperança e verdade.

Agradeço a Dannel, meu marido, minha melhor metade, obrigada por ter me ensinado o que é o amor, e tão grande a intensidade desse amor.

A minhas irmãs, Mércia e Patrícia, por preencher a minha vida de amor e cuidado.

Aos meus sobrinhos, Paula, Rafa, Lipe, Lelê, Laurinha, Miguel e Pedro, presentes dados por minhas irmãs a mim.

A minhas amigas, Elce, Fernanda e Márcia, amigas que sei que posso contar a qualquer hora e a qualquer lugar. Obrigada por dividir comigo momentos bons e ruins, e me fazer ri de ambos.

A minha professora orientadora, Ângela Amâncio, pela excelente orientação para o desenvolvimento desse trabalho.

A minha amiga, Mariana Séfora, pela imensa ajuda em todas as etapas desse trabalho, a amizade de Mari foi um presente que ganhei no mestrado, não tenho palavras para te agradecer. Mari, você me ajudou não só na parte experimental e nas contribuições do trabalho, mas também me ajudou me dando força nos momentos que eu achava que não ia conseguir.

A colega de mestrado Maryane, pela colaboração na fase experimental.

Aos amigos, Emerson, Gica e Rici, pela companhia incrível compartilhada no espaço do laboratório.

Aos alunos de iniciação científica, Gustavo, Iasmym, Davi e Adson, pela participação da execução do projeto.

Aos professores Reginaldo e Belmira, pela atenção dada sempre nos momentos que eu precisava.

Aos professores do programa de pós-graduação em Nutrição, pela troca de experiências durante as disciplinas.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos, durante os meses de realização desse trabalho.

Aos amigos de turma, não só da área de Bases Experimentais. Mas também de Tecnologia de Alimentos e Saúde Pública, por compartilhar esse momento tão importante na minha carreira profissional. Em especial, Jacque, Mila, Nathy, Cris, Gabi e Beta, amigades que me acompanharam na Residência e também no Mestrado.

A todos os técnicos do departamento de Nutrição e da Neurofisiologia, por sempre estar dispostos a ajudar nas dúvidas com o manejo dos animais.

Aos animais, sempre tive a preocupação do manejo com ética e respeito, agradeço por fazer parte da pesquisa como peça fundamental para obtenção dos resultados.

Enfim, a todos que participaram, cada um da sua maneira, mas sempre fundamental para a construção desse trabalho. Eu só tenho a agradecer por tudo. Tenho certeza que essa experiência foi de grande contribuição para minha formação profissional, que considero contínua, pois estamos sempre aprendendo.

RESUMO

Objetivo: Avaliar os efeitos da suplementação com óleo de coco extra virgem (OCV) e/ou da vivência em ambiente enriquecido (AE) sobre a depressão alastrante cortical (DAC) e a peroxidação lipídica em ratos adultos nutridos ou hipernutridos durante o aleitamento. **Materiais e Métodos:** Foram utilizados 85 animais da linhagem *Wistar* machos separados, durante o período de aleitamento, em dois grupos: nutrido (N) constituído de ninhada contendo nove, e, hipernutrido com ninhada composta de três filhotes. O período de suplementação decorreu do 7º ao 30º dia de vida, onde metade dos filhotes de cada grupo recebeu OCV (10 mg/kg/dia, por gavagem), e os demais receberam volume equivalente do veículo (V, cremophor a 0,009%). Ao 36º dia de vida, uma parte de cada grupo experimental (N-V, H-V, N-OCV, H-OCV) foram submetidos ao AE (uma sessão de três horas por dia, durante quatro semanas). Aos 90-120 dias de idade, realizou-se o registro da DAC; após registro, os animais foram sacrificados e o córtex cerebral foi processado para análise da peroxidação lipídica. **Resultados:** A suplementação com o OCV e a vivência no AE desaceleraram a velocidade de propagação da DAC tanto nos animais N, quanto nos H ($p < 0,05$). A hipernutrição *per se* também reduziu a velocidade de propagação da DAC. Os valores médios \pm dp, em mm/min, foram: N-OCV = $3,27 \pm 0,18$; H-OCV = $2,65 \pm 0,26$; N-AE = $2,72 \pm 0,22$; H-AE = $2,54 \pm 0,23$; N = $3,57 \pm 0,23$; H = $2,99 \pm 0,24$. O AE aumentou a peroxidação lipídica no córtex cerebral dos animais N. Os dados (média \pm dp), em nmol de MDA/mg de proteína, foram: N = $1,61 \pm 0,53$; N-AE = $2,33 \pm 0,43$. **Conclusão:** O OCV e o AE são intervenções capazes de reduzir a excitabilidade do cérebro independentemente do estado nutricional imposto durante o aleitamento. Esses efeitos aventam novas possibilidades terapêuticas em processos patológicos relacionados à DAC, tais como a epilepsia, doença neurológica caracterizada por descargas elétricas anormais e excessivas no cérebro de forma recorrentes, e a enxaqueca com aura, cefaleia periódica acompanhada de distúrbios visuais que antecedem a dor .

Palavras-Chaves: Óleo de coco. Ambiente enriquecido. Depressão alastrante da atividade elétrica cortical. Hipernutrição. Estresse oxidativo. Rato.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the effects of the coconut extra virgin oil (CVO) and/or the experience in an enriched environment (EE) on cortical spreading depression (CSD) and the lipid peroxidation in adult rats nourished or overnourished during lactation.

Material and Methods: A total of 85 Wistar male rats were distributed into two groups: nourished (N; obtained from littermates of 9 animals) and overnourished (ON; obtained from littermates of 3 animals). Half of the animals in each group received CVO (10 mg/kg/d; by gavage) and the other half received equivalent volume of vehicle (V, 0,009% cremophor), from 7^o to 30^o day of life. At 36^o day of life, approximately 10 animals from each condition described above (N-V, ON-V, N-CVO, ON-CVO) were submitted to EE (one session of 3 h/day, during 4 weeks). At 90-120 days of life, it was obtained CSD recordings. At the end of the recording sections, the animals were sacrificed and the brain cortices were processed to lipid peroxide analyses.

Results: CVO supplementation, as well as EE decelerated CSD propagation velocity in both N and ON animals ($p < 0.05$). Overnutrition *per se* also reduced CSD propagation velocity. Mean \pm sd, in mm/min, were: N-CVO = 3.27 ± 0.18 ; ON-CVO = 2.65 ± 0.26 ; N-EE = 2.72 ± 0.22 ; ON-EE = 2.54 ± 0.23 ; N = 3.57 ± 0.23 ; ON = 2.99 ± 0.24 . EE increased oxidative stress in brain cortex of N animals. Mean \pm sd, in nmol MDA/mg protein, were: N = 1.61 ± 0.53 ; ON-EE = 2.33 ± 0.43 .

Conclusion: CVO and EE are interventions able to reduce brain excitability independently of nutritional status imposed during lactation. These effects highlight new therapeutic avenues to pathological process related to CSD such as epilepsy (neurological disease characterized by recurrent abnormal and excessive electric discharges in the brain) and migraine (periodic headache accompanied by visual disturbances preceding pain).

Key words: Coconut oil. Enriched environment. Cortical electrical activity spreading depression. Overnutrition. Oxidative stress. Rat.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Condição experimental de ambiente enriquecido	21
Figura 2 - Alojamento dos animais em ambiente padrão e enriquecido	21
Figura 3 - Divisão dos grupos experimentais	29
Figura 4 – Distribuição das etapas experimentais cronologicamente	30
Figura 5 - Velocidade de propagação da depressão alastrante cortical	35
Figura 6 - Registro eletrofisiológico da depressão alastrante cortical	36
Figura 7 - Concentrações de TBARS no córtex cerebral	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição nutricional do óleo de coco extra virgem	18
Tabela 2 - Pesos corporais e encefálicos de ratos	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AE Ambiente Enriquecido

ANOVA Análise de Variância

CEUA Comissão de Ética no Uso de Animais

CONCEA Conselho Nacional de Controle Experimentação Animal

DAC Depressão Alastrante Cortical

DP Desvio Padrão

H Hipernutrido

MDA Malondialdeído

N Nutrido

OCV Óleo de Coco Extra Virgem

TBARS Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

UFPE Universidade Federal de Pernambuco

V Solução veículo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REFERENCIAL TEÓRICO	15
3. HIPÓTESE	26
4. OBJETIVO	27
5. METODOLOGIA	28
5.1. Delineamento experimental	28
5.2. Procedimentos para registro da depressão alastrante	30
5.2.1. Cirurgia	30
5.2.2. Registros eletrofisiológicos	30
5.3. Coleta do encéfalo	31
5.4. Análise da peroxidação lipídica no córtex cerebral	31
5.5. Análise estatística	32
6. RESULTADOS	33
6.1. Peso corporal	33
6.2. Peso encefálico	33
6.3. Velocidade de propagação da depressão alastrante cortical	34
6.4. Estado Oxidativo	37
7. DISCUSSÃO	38
8. CONCLUSÕES	42
REFERÊNCIAS	43
ANEXO	52

1. Introdução

As fases iniciais da vida constituem um período crítico para o desenvolvimento do sistema nervoso. Durante a gestação e lactação, o cérebro se desenvolve com velocidade máxima e está mais suscetível a insultos ambientais, como por exemplo, a inadequação do estado nutricional (MORGANE et al., 1993). Dados têm demonstrado que a ingestão calórica excessiva (hipernutrição) durante o período crítico do desenvolvimento pode gerar sequelas duradouras ao sistema nervoso. Por exemplo, tem sido descrito que a maior disponibilidade de leite para ratos durante o aleitamento, fato que geralmente resulta em hipernutrição, reduz a excitabilidade cerebral (ROCHA-DE-MELO et al., 2006). Esse efeito pode ser registrado tanto em animais recém-desmamados, como nos ratos adultos.

Nos dias hodiernos, a ingestão alimentar acima das necessidades nutricionais tem ocorrido em idades cada vez mais precoces, envolvendo o período de desenvolvimento crítico do sistema nervoso (PUJALTE et al., 2017). Assim, é de extrema relevância a investigação de estratégias que possam minimizar o impacto deletério dessa hipernutrição. Com este objetivo, foram analisadas no presente trabalho a suplementação com o óleo de coco extra virgem e o ambiente enriquecido.

Alguns estudos têm destacado que o óleo de coco é uma alternativa viável à prevenção de doenças cardíacas e ao câncer (MEKSAWAN et al., 2004). Ele também tem sido proposto como coadjuvante no tratamento de doenças neurológicas, por exemplo, o mal de Parkinson (GASIOR; ROGAWSKI; HARTMAN, 2006). Quanto ao ambiente enriquecido, tem sido demonstrado o seu papel em estimular a neurogênese adulta e a plasticidade sináptica (KANG et al., 2016; STAMENKOVIC et al., 2017). A exposição ao enriquecimento ambiental pode trazer efeitos benéficos sobre as funções cognitivas, além de interferir em comportamentos relacionados à memória e ansiedade (Bhagya et al, 2017). Esses dados indicam que ambas as condutas poderiam ser benéficas em minimizar as possíveis sequelas de um insulto nutricional precoce (a hipernutrição).

O modelo experimental utilizado neste trabalho para verificar os efeitos da hipernutrição precoce, da suplementação com óleo de coco extra virgem e do ambiente enriquecido foi a depressão alastrante cortical (DAC). Através da DAC é possível inferir sobre o nível de excitabilidade do cérebro. Adicionalmente, estudos que utilizam a DAC contribuem para esclarecer mecanismos fisiológicos subsequentes ao fenômeno. Pois, esses mecanismos têm sido associados a patologias de interesse clínico tais como epilepsia, enxaqueca com aura, isquemia (VIGGIANO et al., 2016). Em conjunto com a análise da DAC, foi verificado o estresse oxidativo no córtex cerebral.

Tais intervenções, a suplementação com óleo de coco virgem e a vivência com o ambiente enriquecido poderiam desempenhar um papel complementar no tratamento de doenças relacionadas com a excitabilidade cerebral. Além de, interferir de forma benéfica no efeito do insulto precoce da hipernutrição, a qual foi imposta em um período crítico de desenvolvimento do sistema nervoso.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

Hipernutrição

A nutrição é um dos principais fatores não genéticos a influenciar o crescimento e desenvolvimento do sistema nervoso (MORGANE et al., 1993). Está bem estabelecido que a ocorrência de má nutrição durante o período crítico de desenvolvimento ocasiona sequelas transitórias, mas também permanentes ao sistema nervoso (ROCHA-DE-MELO et al., 2004; ROCHA-DE-MELO et al., 2006). Atualmente, um dos principais problemas de saúde pública é a ingestão calórica excessiva e esta condição tem se consolidado desde as mais tenras idades (PUJALTE et al., 2017). O período crítico de desenvolvimento do sistema nervoso inclui, em seres humanos, o terceiro trimestre de gestação até os primeiros anos de vida. No rato, ele é preponderante na fase de lactação, as três primeiras semanas após o nascimento (DOBBING, 1968).

A hipernutrição é definida como o consumo excessivo de alimentos de forma que a saúde é afetada adversamente (PARKS; NAOMI, 2012). A hipernutrição ou superalimentação ou hiperalimentação pode evoluir para a obesidade. Esta condição aumenta o risco de problemas de saúde graves, incluindo doença cardiovascular, hipertensão, câncer e diabetes tipo 2 (BENDER, 2014). Além disso, a ingestão alimentar excessiva também pode prejudicar o funcionamento do sistema nervoso (ENGIN, 2017).

Dados da literatura têm mostrado que a morfologia dos vasos sanguíneos cerebrais de camundongos adultos se tornou alterada em consequência da ingestão materna de dieta hiperlipídica durante a gestação. Essa alteração vascular pode favorecer o acúmulo de peptídios β -amiloides no cérebro, que é uma característica da doença de Alzheimer (HAWKES et al., 2015; MORRONE et al., 2015). Rocha-de-Melo et al. (2004) encontraram que ninhadas de ratos com maior disponibilidade de leite materno durante o aleitamento apresentavam redução da excitabilidade cerebral tanto imediatamente após o desmame, como na idade adulta. Essa maior oferta de leite era decorrente da formação de ninhada de ratos com número reduzido de animais (as ninhadas continham apenas três filhotes).

Experimentalmente, existem algumas formas de induzir hipernutrição nas fases iniciais da vida. Dentre estes modelos está aquele, mencionado acima, em que se reduz o tamanho da ninhada. A ninhada padrão contém, geralmente, cerca de oito a nove filhotes; enquanto que, a ninhada reduzida é constituída por três animais. Nesta técnica, a rata é mantida com a ninhada padrão até o terceiro dia de vida dos filhotes. Neste período, ela ajustará a produção de leite para o total de animais presentes na ninhada. Após essa fase (três dias), a ninhada é reduzida, mas a produção de leite materno é mantida como se ainda estivesse a ninhada padrão (DAVIDOWA; PLAGEMANN, 2001). Dessa forma, os ratos remanescentes terão uma maior disponibilidade de leite.

O modelo de redução da ninhada está associado a um rápido aumento de deposição de gordura no período neonatal, que persiste com excesso de peso e hiperfagia na vida adulta (PLAGEMANN et al., 2010). Quando adultos, os animais apresentam tolerância reduzida à glicose, dislipidemia, hiperinsulinemia, hiperleptinemia e aumento da pressão arterial. Todas, características que se assemelham à Síndrome Metabólica em humanos (PLAGEMANN et al., 2010).

O fenótipo semelhante à síndrome metabólica observado nos animais adultos provavelmente é estabelecido desde o aleitamento. Pois, a hipernutrição, decorrente da redução da ninhada, ocorre no período de plasticidade fenotípica. A hipernutrição ocasionaria uma desestabilização da programação normal dos sistemas neuropeptidérgicos hipotalâmicos envolvidos na regulação do peso corporal e do metabolismo ao longo da vida (PLAGEMANN et al., 2010). A plasticidade fenotípica é um fenômeno peculiar do organismo durante períodos críticos do desenvolvimento, que confere ao indivíduo a habilidade para responder às diferentes condições ambientais e alterar sua fisiologia ou morfologia de acordo com as condições desse ambiente (COOPER et al., 2002). Este paradigma sugere que a susceptibilidade a doenças na vida adulta pode ser resultado da influência da nutrição e da exposição ambiental a agentes tóxicos e ao estresse durante o período fetal e neonatal (HEINDEL, 2007).

Além de estabelecer condição semelhante à síndrome metabólica e de promover alterações eletrofisiológicas cerebrais, o modelo de redução da ninhada também pode favorecer o estresse oxidativo. Foi observado que ele induz a diminuição da atividade das enzimas catalase, superóxido dismutase e glutathiona

peroxidase; bem como ocasiona aumento nos níveis de malondialdeído no fígado, no plasma (CONCEIÇÃO et al., 2013) e em tecidos do miocárdio (HABBOUT et al., 2013). O estresse oxidativo é resultante do acúmulo tecidual de espécies reativas de oxigênio e está na base de várias disfunções fisiológicas periféricas e centrais (ORTIZ et al., 2017).

Diante do exposto, há poucas dúvidas de que a ingestão calórica excessiva nas fases iniciais da vida acarretam prejuízos ao funcionamento de todo o organismo, incluindo o sistema nervoso. Assim, o objetivo deste trabalho é propor intervenções que possam minimizar os possíveis efeitos deletérios dessa hipernutrição precoce às funções cerebrais. Aqui, são propostas a suplementação com óleo de coco extra virgem e a vivência em ambiente enriquecido.

➤ **Óleo de Coco Extra Virgem**

O óleo de coco extra virgem (OCV) é o óleo natural puro obtido do leite do coco (*Cocos Nucifera Linn Palmae*), sem o uso de produtos químicos ou de tratamento térmico a altas temperaturas. Essa substância vem sendo objeto de estudo devido às propriedades funcionais que lhe tem sido atribuídas (INTAHPHUAK; KHONSUNG; PANTHOUNG, 2010). Em relação à sua composição nutricional, ele é um produto de alto valor energético, constituído predominantemente por gorduras, conforme demonstrado a seguir (**Tabela 1**). No que se refere ao perfil de ácidos graxos saturados, o óleo de coco extra virgem (COPRA®) é constituído em %/100g: C 6:0 capróico (0,38), C 8:0 caprílico (5,56), C 10:0 cáprico (4,99), C 12:0 láurico (45,78), C 14:0 mirístico (18,56), C 16:0 palmítico (8,85), C 18:0 esteárico (3,39); e pelos ácidos graxos poli-insaturados: C 18:1 Ômega 9 – oleico (5,65) e C 18:2 Ômega 6 – linoleico (0,94).

Tabela 1: Composição nutricional do óleo de coco extra virgem da marca Copra®

Composição (g/100 ml)	
Valor Energético	833,33 kcal
Carboidratos	0,00 g
Proteínas	0,00 g
Gorduras Totais	93,33 g
Gorduras Saturadas	86,66 g
Gorduras Trans	0,00 g
Gorduras Monoinsaturadas	4,66 g
Gorduras Poliinsaturadas	1,33 g
Colesterol	0,00 mg
Fibra Alimentar	0,00 g
Sódio	0,00 g

Fonte: Rótulo do óleo de coco extra virgem (Copra®)

Dentre as propriedades atribuídas ao OCV, destacam-se ação antimicrobiana (SHILLING et al., 2013); aceleração da cicatrização de feridas (NEVIN; RAJAMOHAN, 2010); redução modesta da gordura abdominal (LIAU; LEE; CHEE, 2011); propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (VYSAKH et al., 2014); efeito analgésico e antipirético (INTAHPHUAK; KHONSUNG; PANTHONG, 2010); ações anticancerígenas (LAW et al., 2014); e, diminuição do risco de doenças coronarianas (FERANIL et al., 2011).

A crescente popularidade do OCV tem estado associada, sobretudo, aos seus benefícios potenciais ao sistema cardiovascular. O OCV é rico em ácidos graxos de cadeia média e essas substâncias têm sido consideradas cardioprotetoras (BABU et al., 2014). A utilização de ácidos graxos isoladamente, ou combinada ao exercício físico, tem sido sugerida como estratégia de intervenção em doenças cardiovasculares (BABU et al., 2014). Adicionalmente, o OCV também tem sido proposto como alternativa coadjuvante no tratamento de doenças neurológicas (NAFAR; MEAROW, 2014).

Foram descritas ações benéficas do OCV no combate a todas as formas de demência, ao mal de Parkinson, às sequelas isquêmicas e à lesão cerebral traumática (GASIOR; ROGAWSKI; HARTMAN, 2006). Além do OCV, Begum (2014) reportou que dietas ricas em gordura, especialmente aquelas que possuem alto teor de triglicerídeos de cadeia média, podem retardar o envelhecimento do cérebro, possivelmente devido às ações antioxidantes desses lipídeos. Pois, o papel antioxidante do OCV também tem sido destacado recentemente. Por exemplo, foram encontrados níveis elevados de antioxidantes cerebrais em ratos tratados com OCV (ALVES et al., 2015; YEAP et al., 2015).

Evidências têm indicado que substâncias antioxidantes podem reduzir a excitabilidade cerebral (SCHNEIDER et al., 2004). Considerando o possível papel antioxidante do OCV, ele se torna um candidato relevante em investigações que envolvam a excitabilidade do sistema nervoso. A depressão alastrante cortical (DAC) tem sido descrita como um fenômeno de excitabilidade cerebral e que está relacionado a doenças que também apresentam essa condição, como a epilepsia (VIGGIANO et al., 2016). Daí o objetivo de verificar o efeito do OCV sobre a DAC tanto em condições nutricionais padrão, como na vigência de ingestão alimentar excessiva. Adicionalmente, é digno de nota mencionar que o OCV é obtido a partir de um produto regional, abundante no país. Assim, estudos que avaliem as suas propriedades são deveras relevantes, pois contribuem para aumentar o conhecimento do potencial dessa substância no aprimoramento das funções orgânicas, incluindo a eletrofisiologia do cérebro.

➤ **Ambiente Enriquecido**

O ambiente enriquecido (**Figura 1**) consiste em uma condição experimental que associa relações sociais e interações com objetos estimulantes (SAMPEDRO-PIQUERO; ZANCADAMENENDEZ; et al., 2013). Essa condição se baseia em três princípios (HIRASE; SHINOHARA, 2014):

- 1) conter uma área habitável maior com presença de brinquedos, túneis e rodas de corrida que são colocados com o objetivo de promover experiência sensorial e motora aos animais;

- 2) os objetos que compõe o ambiente enriquecido são regularmente modificados, de modo a estimular a curiosidade e a exploração dos animais;
- 3) os animais são alojados em grupos para favorecer maior interação social.

Tem sido demonstrado, através de investigações comportamentais, celulares e moleculares, que o enriquecimento ambiental aperfeiçoa mecanismos de plasticidade dependentes da experiência tais como a neurogênese adulta e a plasticidade sináptica (KANG et al., 2016). Além disso, o enriquecimento ambiental permite que os animais modifiquem o seu comportamento para se adaptarem à nova condição de habitação (MÁRMOL et al., 2015). Ou seja, a vivência em um ambiente mais rico induz alterações neuroquímicas, neuroanatômicas e comportamentais consideradas benéficas à saúde do animal.

Tem sido demonstrado que o enriquecimento ambiental retarda o aparecimento e progressão da doença de Huntington em ratos transgênicos (NITHIANANTHARAJAH; HANNAN, 2006). Semelhantemente, esse efeito protetor é observado na doença de Alzheimer, na doença de Parkinson, no X frágil, na síndrome de Down (NITHIANANTHARAJAH; HANNAN, 2006). Ou seja, o enriquecimento ambiental pode atenuar efeitos deletérios de vários processos patológicos que afetam o funcionamento adequado do sistema nervoso central. Uma comparação entre neurônios de animais expostos ao ambiente enriquecido e neurônios de animais submetidos à condição de ambiente padrão é demonstrado na **Figura 1**, a seguir. Enquanto que na **Figura 2** está demonstrado as gaiolas utilizadas na condição experimental do ambiente enriquecido bem com do ambiente padrão utilizadas na metodologia desse trabalho.

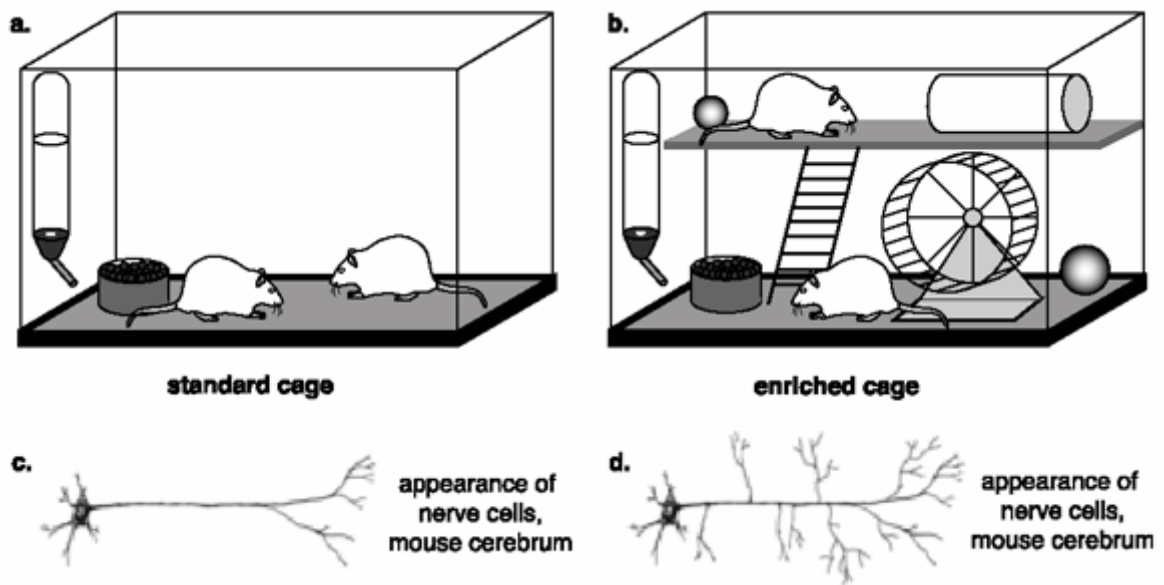


Figura 1: Condição experimental de ambiente enriquecido e comparação entre células nervosas de animais expostos a ambiente padrão e ambiente enriquecido.

Fonte: www.movementislife.be



Figura 2 – Alojamento dos animais em ambiente padrão e enriquecido. **A** – Ambiente padrão para ratos. **B** – Ratos em sessão com ambiente enriquecido.

*Escala no canto inferior esquerdo da imagem: 30 cm. Fonte: AE elaborada pela autora.

Antes de 1960, o cérebro era considerado pela comunidade científica como imutável, sujeito apenas ao controle da genética. No início dos anos 60, pesquisadores especularam que influências ambientais poderiam ser capazes de alterar a estrutura do cérebro (DIAMOND, 2013). Desde então, a capacidade do cérebro para responder aos estímulos ambientais, especificamente enriquecimento, tornou-se um fato aceito entre neurocientistas (ZHU et al., 2014).

O córtex cerebral, área associada com o processamento cognitivo superior, é mais receptivo do que outras regiões do cérebro ao enriquecimento ambiental. (HALPERIN; HEALEY, 2011). Embora o cérebro possua uma organização macroestrutural relativamente constante, o córtex está em constante mudança em sua complexa microarquitetura. O córtex é fortemente moldado pelas experiências vivenciadas ao longo da vida, incluindo aquelas que ocorrem mesmo antes do nascimento (DIAMOND, 2013).

Um dos mecanismos que tem sido proposto para explicar a ação neuroprotetora do ambiente enriquecido é seu possível papel em reforçar as defesas antioxidantes do organismo. Mármol et al. (2015) documentaram que o enriquecimento ambiental reduz marcadores de estresse oxidativo no hipocampo e no córtex cerebral, bem como aperfeiçoa as reações antioxidantes do cérebro. Neste trabalho o objetivo foi verificar se a vivência em um ambiente mais rico pode influenciar a eletrofisiologia do córtex cerebral, a depressão alastrante cortical.

➤ **Depressão Alastrante Cortical**

A Depressão Alastrante Cortical (DAC) é definida como uma onda de propagação lenta de despolarização neuronal e glial, que dura alguns minutos. A DAC pode se desenvolver no córtex cerebral ou em outras áreas do cérebro após estimulação elétrica, mecânica ou química (ENGER et al., 2015). É caracterizada por um aumento no meio extracelular de íons potássio e de glutamato, bem como por aumento intracelular de íons de sódio e de cálcio. Essas mudanças iônicas produzem uma corrente lenta e contínua de alterações de potenciais que podem ser registradas no meio extracelular. Além disso, a DAC está associada a alterações no fluxo sanguíneo do parênquima cortical (ENGER et al., 2015).

Existe forte evidência clínica e experimental de que a DAC está envolvida no mecanismo da epilepsia, enxaqueca com aura, acidente vascular cerebral, hemorragia subaracnóidea e lesão cerebral traumática (CUI; KATAOKA; WATANABE, 2014; MCCOMAS, UPTON, 2015). Outros dados demonstram que a dieta e mesmo nutrientes isolados podem influenciar a propagação DAC (GUEDES, 2011). Referente aos lipídios, alguns estudos merecem destaque.

Rocha-de-Melo et al. (2004) mostraram que a hipernutrição em decorrência de redução da ninhada induz redução da velocidade de propagação da DAC em animais adultos. Germano et al. (2013) encontraram que a ingestão de dieta de cafeteria por mães lactantes dificulta a propagação da DAC no cérebro dos filhotes adultos. Também tem sido relatado prejuízo à propagação da DAC na prole de ratos alimentados com dieta normocalórica, porém cuja fonte de gordura é o óleo de coco (BORBA et al., 2010). Esses achados indicam que a ingestão calórica excessiva nas fases iniciais da vida modifica a eletrofisiologia cerebral. Além disso, o óleo de coco *per se* mesmo se usado na elaboração da dieta do animal é um fator capaz de interferir com aquele fenômeno no córtex.

Além dos fatores dietéticos, o enriquecimento ambiental também interfere com a eletrofisiologia do cérebro. Tem sido descrito que o limiar para deflagração da depressão alastrante está aumentado *in vitro*, em fatias de hipocampo de ratos que vivenciaram um ambiente enriquecido. Entretanto investigações adicionais, especialmente *in vivo*, são necessárias para a melhor compreensão do efeito desses fatores, principalmente do OCV e do ambiente enriquecido, sobre a fisiologia e as defesas metabólicas do organismo.

➤ **Estresse Oxidativo**

O estresse oxidativo se caracteriza por um desequilíbrio entre os sistemas oxidativos e antioxidantes das células e tecidos, que resulta no acúmulo de radicais livres (RANI et al., 2016). Esses radicais oxidativos são produzidos a partir do metabolismo celular aeróbio normal e são essenciais para governar os processos metabólicos através da sinalização redox (SIES; BERNDT; JONES, 2017). Porém, o excesso deles confere danos a biomoléculas, de maneira que é necessário um sistema de controle para evitar a sua acumulação. É o sistema antioxidante que desempenha um papel decisivo na regulação dos níveis desses radicais livres

e desregulação no sistema de defesa redox pode culminar em neurodegeneração (GILGUN-SHERKI; MELAMED; OFFEN, 2001; SARRAFCHI et al., 2016).

O sistema nervoso é especialmente suscetível ao acúmulo de radicais livres, dada a sua constituição bioquímica. Ele contém um pool de lipídios insaturados cujas duplas ligações são pontos de ataques dos radicais livres, os quais iniciam a cascata de reações que danificam as células neurais e gliais (MEO et al., 2016). Por outro lado, o sistema nervoso é pobre em defesas antioxidantes. Por exemplo, a atividade antioxidante cerebral é cerca de 10% da atividade hepática (MEO et al., 2016).

Conforme mencionado, a organização estrutural do sistema nervoso, mais especificamente seu elevado conteúdo lipídico, o torna bastante vulnerável à peroxidação (FREEMAN et al., 2012). A peroxidação lipídica é uma das consequências do acúmulo de radicais livres e é sabido que essa reação bioquímica está diretamente relacionada ao teor lipídico do tecido (FREEMAN et al., 2012). Assim, um cérebro formado na vigência de hipernutrição provavelmente contém um maior conteúdo de gorduras e isto aumentaria sua possibilidade de sofrer peroxidação (FREEMAN et al., 2012; REGE et al., 2013). O aumento da disponibilidade de antioxidantes poderia atenuar a propensão aumentada à peroxidação cerebral.

Antioxidantes são substâncias que neutralizam os radicais livres. Eles podem ocorrer endogenamente, sistema antioxidante enzimático; ou, provir de fontes exógenas, sistema antioxidante não enzimático, em que a dieta é o principal fornecedor. Os antioxidantes enzimáticos incluem as proteínas catalase, glutathione peroxidase e superóxido dismutase (GILGUN-SHERKI; MELAMED; OFFEN, 2001). Os não enzimáticos contêm os antioxidantes de ação direta, fundamentais na defesa contra o estresse oxidativo, e os de ação indireta. Dentre os de ação direta, destacam-se os ácidos ascórbico e lipoico, os polifenóis e carotenoides. Os antioxidantes de ação indireta são, principalmente, agentes quelantes que se ligam a metais redox para evitar a geração de radicais livres (GILGUN-SHERKI; MELAMED; OFFEN, 2001).

Assim, considerando que tem sido atribuído tanto ao OCV, como ao ambiente enriquecido, um efeito antioxidante, faz-se relevante investigar a comprovação desse efeito através de uma abordagem eletrofisiológica. Ambas as intervenções são acessíveis economicamente, de forma que se confirmado seu efeito elas

poderiam ser propostas como estratégias terapêuticas para patologias que afetam o sistema nervoso; inclusive algumas, às vezes, refratárias à conduta farmacológica atual como a epilepsia e a enxaqueca com aura.

3. HIPÓTESE

A suplementação com óleo de coco extra virgem (OCV), ou exposição a um ambiente enriquecido, ou ainda a soma das duas estratégias normalizam a velocidade de propagação da DAC e reduzem o incremento da peroxidação lipídica decorrente da hipernutrição imposta durante o aleitamento.

4. OBJETIVOS

a. GERAL

Avaliar os efeitos da suplementação com óleo de coco extra virgem (OCV) e/ou do ambiente enriquecido sobre a depressão alastrante cortical e a peroxidação lipídica em ratos adultos nutridos e hipernutridos durante o aleitamento.

b. ESPECÍFICOS

- Obter os pesos corporais e encefálicos e relacionar com hipernutrição imposta durante o aleitamento;
- Avaliar a velocidade de propagação da depressão alastrante cortical como índice do funcionamento cerebral;
- Analisar os níveis de peroxidação lipídica no córtex cerebral.

5. METODOLOGIA

Os procedimentos experimentais foram realizados no Laboratório de Neurofisiologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). O projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), Centro de Biociências da UFPE (protocolo 23076.048535/2015-78). Todos os procedimentos foram realizados conforme as resoluções e diretrizes determinadas pelo CONCEA (Conselho Nacional de Controle Experimentação Animal) (Anexo A).

5.1. Delineamento experimental

Foram utilizados ratos machos da linhagem *Wistar*, provenientes da colônia do Departamento de Nutrição da UFPE. Esses animais foram mantidos sob condições padrão de biotério, em sala à temperatura de 23 ± 1 °C, submetidos a um ciclo artificial claro-escuro de 12/12 horas (fase escura das 19:00 h às 7:00 h), com acesso livre à água e à comida (ração para roedores Presence®).

Para as determinações experimentais, os ratos foram distribuídos aleatoriamente, a partir do terceiro dia de vida, em dois grupos experimentais: nutrido e hipernutrido (ingestão alimentar excessiva) (**Figura 2**). O grupo nutrido (N), proveniente de cinco matrizes, foi formado por ninhadas de tamanho padrão, constituídas por nove animais. O grupo hipernutrido (H), obtido a partir de 14 matrizes, foi formado por ninhadas com número reduzido de animais, contendo apenas três filhotes. Os ratos foram desmamados ao 21º dia de vida.

A partir do 7º até o 30º dia de vida, metade dos filhotes de cada condição nutricional, recebeu, orogastricamente, 10 ml/kg/dia de óleo de coco extra virgem (OCV). A outra metade recebeu volume equivalente da solução veículo (V). O veículo consistia de uma solução aquosa de cremophor a 0,009% (Sigma®), solvente orgânico utilizado para preparo da solução à base de OCV. A dose de OCV foi escolhida conforme proposto por Zacaria et al. (2011) e Alves et al. (2015). Os animais foram suplementados diariamente sempre no mesmo horário, de 07:30 às 08:30h.

Uma semana após o término da suplementação com OCV ou veículo, cerca de dez animais de cada grupo foram submetidos ao ambiente enriquecido (AE) durante o período de quatro semanas. Os grupos AE foram alojados, diariamente, durante três horas, em gaiolas grandes, conforme descrito por Sampedro-Piqueiro et al. (2013). As gaiolas possuíam vários objetos tais como brinquedos, rodas, tubos de plástico de diferentes diâmetros, entre outros. Para assegurar a presença de um componente *novo*, a configuração das gaiolas era modificada uma vez por semana. Isto é, modificava-se a localização de alguns dos objetos que compunham o ambiente enriquecido; bem como, substituía-se alguns deles (SAMPEDRO-PIQUEIRO et al., 2013). Os animais remanescentes de cada condição experimental permaneceram nas gaiolas padrão. Esses foram os animais controle, sem AE.

Em suma, todo delineamento experimental consistiu em oito grupos, contendo cerca de dez animais em cada um deles (**Figura 3**).

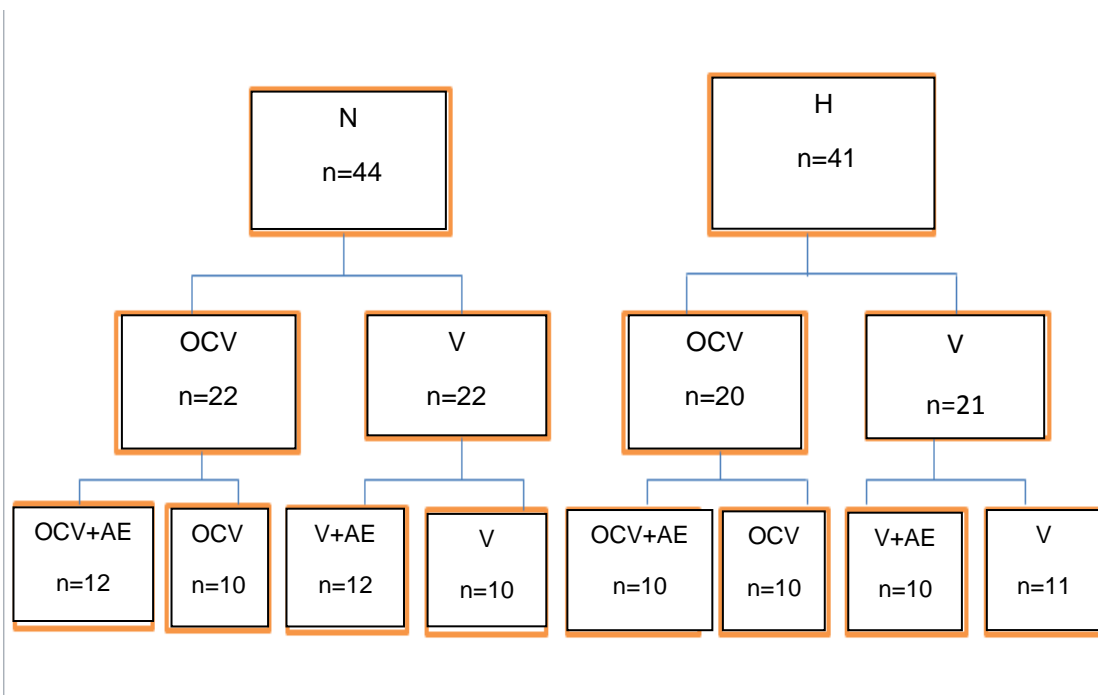


Figura 3 - Divisão dos grupos experimentais – Desenho Experimental

As etapas experimentais estão demonstradas de forma cronológica na figura a seguir (**Figura 4**):

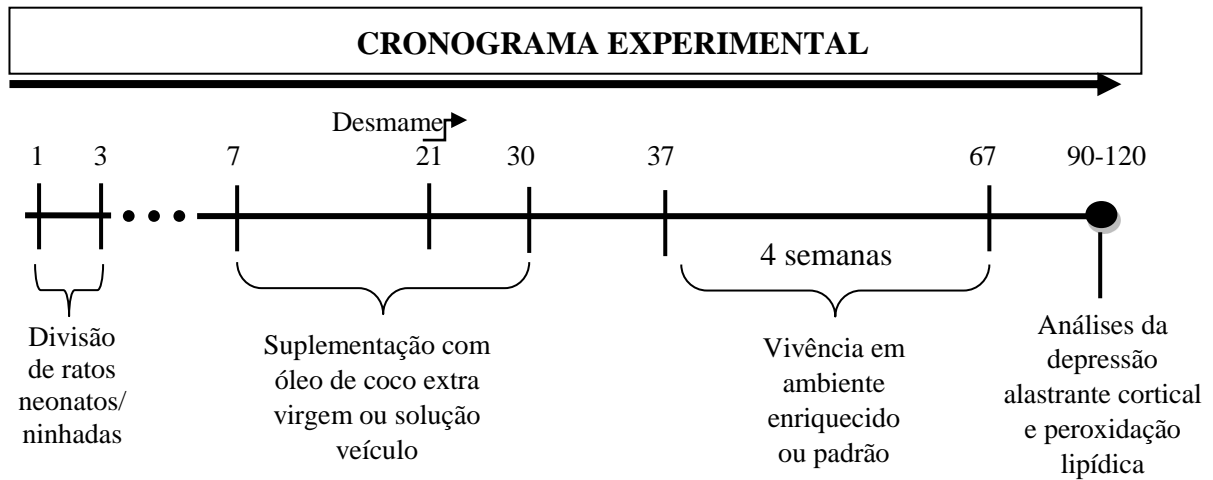


Figura 4 – Distribuição das etapas experimentais cronologicamente

5.2. Procedimentos para registro da depressão alastrante

5.2.1. Cirurgia

Cada animal, com idades entre 90 e 120 dias, foi anestesiado com uma solução contendo mistura de uretana a 10 % + cloralose a 0,4 %, à dose de 1000 mg/kg de uretana + 40 mg/kg de cloralose, via intraperitoneal. Posteriormente, foi procedida uma traqueostomia para introdução de uma cânula de polietileno. Em seguida, a cabeça do animal foi fixada em aparelho estereotáxico (Insight), de modo a permitir a incisão e remoção da pele e do periósteo para exposição do crânio. Por meio de trepanação, foram feitos três orifícios (anterior, médio e posterior, de cerca de 2 a 4 mm de diâmetro cada), alinhados paralelamente à linha média, em nível do hemisfério cerebral direito. Após tais procedimentos cirúrgicos, os animais foram submetidos ao registro eletrofisiológico da DAC. Durante o período de registro, a temperatura retal do animal foi mantida em torno de 37 ± 1 °C.

5.2.2. Registros eletrofisiológicos

A DAC foi provocada aplicando-se o estímulo químico (solução de KCl a 2%) a um ponto da superfície cortical frontal, durante um minuto, através do orifício

anterior. Os registros eletrofisiológicos foram feitos utilizando-se eletrodos impolarizáveis (tipo “Ag-AgCl”), conectados a um polígrafo. Em dois pontos corticais parietais (um em cada orifício) foi registrada a variação lenta de voltagem que acompanha a DAC. As variações corticais de voltagem foram registradas contra um eletrodo de referência comum, colocado sobre os ossos nasais, nos quais o potencial é invariável. O registro foi feito por um período de 4 horas. A velocidade de propagação da DAC foi calculada com base na distância entre os dois eletrodos registradores e no tempo gasto pela DAC para percorrer esta distância. Uma vez obtidos os valores desses cálculos, eles foram tabulados no programa Excel e Sigma Stat versão 3.0 para a realização das análises estatísticas.

5.3. Coleta do encéfalo

Após registro da DAC, estando os animais profundamente anestesiados, eles foram sacrificados através de lesão bulbar. O encéfalo foi dissecado e pesado em balança digital eletrônica (capacidade de 220 g, sensibilidade de 0,01 g, modelo AY220, Shimadzu do Brasil Comércio Ltda, São Paulo, Brasil). Então, os encéfalos foram mantidos em estufa (Fanen Ltda), à temperatura de 100 °C, para obtenção do peso encefálico seco.

5.4. Análise da peroxidação lipídica no córtex cerebral

Foi mensurada por meio da produção de metabólitos reativos ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), principalmente o malondialdeído (MDA), no homogenato cerebral, segundo o método descrito por Ohkawa et al. (1979). Neste ensaio, a reação foi realizada em dodecil sulfato de sódio 8,1%, ácido acético 20% e ácido tiobarbitúrico 0,8%. Para realização dos cálculos, foi feita uma curva padrão de 1,1,3,3-tetrametoxipropano.

A mensuração foi realizada espectrofotometricamente, a 532 nm, em leitor de placas (Thermo Scientific, varioscanner flash spectral scanning multimode reader). Os resultados foram expressos em nM equivalentes de MDA/mg proteína. A determinação de proteínas totais no córtex cerebral foi realizada conforme Bradford (1976), utilizando-se uma curva padrão com solução de albumina.

5.5. Análise estatística

A análise de variância (ANOVA) foi empregada para analisar os dados. Nas comparações em que a mesma apontou diferenças significantes foi aplicado o teste para comparação múltipla de Holm-Sidak. Em todos os casos, foi considerado como nível de significância para rejeição da hipótese nula, um valor de $P < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1. Peso corporal

ANOVA indicou que o peso corporal dos animais adultos hipernutridos durante o aleitamento foi maior do que o dos animais nutridos ($p < 0,05$). Os valores médios \pm desvio padrão do peso corporal foram: N-V-S/AE 335,11 \pm 29,27 g; H-V-S/AE 368,08 \pm 47,61 g. O peso corporal dos animais tratados com OCV ou que vivenciaram um ambiente enriquecido foi semelhante ao de seus respectivos controles (veículo ou ambiente padrão).

6.2. Peso encefálico

Houve um aumento significativo do peso encefálico úmido dos animais hipernutridos, em relação aos respectivos nutridos ($p < 0,05$). Os valores médios \pm desvio padrão do peso encefálico úmido foram: N-V-S/AE 1,78 \pm 0,12 g; H-V-S/AE 1,85 \pm 0,16 g. Quanto ao peso encefálico seco e ao peso relativo não houve diferenças em quaisquer das análises realizadas. Além disso, nem o tratamento com OCV, nem a vivência em ambiente enriquecido alteraram quaisquer das medições de pesos encefálicos de forma estatisticamente significativa. Os dados (média \pm desvio padrão) estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Pesos corporais e encefálicos de ratos adultos, hipernutridos durante o aleitamento.

Grupos	Peso corporal (g)	Peso encefálico (g)		Peso relativo
		Úmido	Seco	
N-V-S/AE	335,11 ± 29,27 (n = 10)	1,78 ± 0,12 (n = 6)	0,40 ± 0,03 (n = 6)	0,52 ± 0,05 (n = 6)
N-OCV-S/AE	317,82 ± 39,10 (n = 10)	1,60 ± 0,22 (n = 7)	0,35 ± 0,05 (n = 7)	0,52 ± 0,04 (n = 7)
N-V-AE	308,35 ± 38,19 (n = 12)	1,65 ± 0,13 (n = 6)	0,36 ± 0,03 (n = 6)	0,50 ± 0,03 (n = 6)
N-OCV-AE	307,43 ± 46,08 (n = 12)	1,63 ± 0,20 (n = 6)	0,37 ± 0,03 (n = 6)	0,51 ± 0,03 (n = 6)
H-V-S/AE	368,08 ± 47,61* (n = 10)	1,85 ± 0,16* (n = 11)	0,40 ± 0,04 (n = 11)	0,51 ± 0,06 (n = 11)
H-OCV-S/AE	343,53 ± 46,93* (n = 10)	1,81 ± 0,10* (n = 9)	0,40 ± 0,02 (n = 9)	0,52 ± 0,06 (n = 9)
H-V-AE	356,58 ± 45,42* (n = 10)	1,82 ± 0,15* (n = 8)	0,40 ± 0,03 (n = 8)	0,52 ± 0,05 (n = 8)
H-OCV-AE	345,79 ± 46,14* (n = 10)	1,8790 ± 0,13* (n = 8)	0,4110 ± 0,02 (n = 8)	0,5150 ± 0,02 (n = 8)

Os animais foram submetidos à suplementação com óleo de coco extra virgem (OCV) ou veículo (V) e/ou a ambiente enriquecido (AE). Os dados são expressos em média ± desvio padrão. O número de animais está apresentado entre parênteses.

*indica diferença estatisticamente significativa entre os animais hipernutridos (H) e os respectivos nutridos (N) (ANOVA duas vias, seguida por Holm-Sidak).

6.3. Velocidade de propagação da depressão alastrante cortical

Referente à condição nutricional, os animais adultos hipernutridos durante o aleitamento, apresentaram desaceleração da velocidade de propagação da DAC, quando comparado aos animais nutridos ($p < 0,001$). Os valores médios ± desvio padrão da velocidade da DAC foram: nutridos, 3,57 ± 0,23 mm/min; hipernutridos, 2,99 ± 0,24 mm/min.

O tratamento com OCV durante o aleitamento também reduziu a velocidade de propagação da DAC ($p < 0,001$). Esse efeito pode ser observado tanto nos animais nutridos, como nos hipernutridos. Não houve interação entre as variáveis nutrição e

tratamento com OCV. Os valores médios \pm desvio padrão da velocidade da DAC foram: N-OCV, $3,27 \pm 0,18$ mm/min; H-OCV, $2,65 \pm 0,26$ mm/min.

Efeito similar ao do OCV foi observado para a vivência em ambiente enriquecido. Isto é, a ação desaceleradora do ambiente enriquecido ocorreu independentemente do estado nutricional ao aleitamento ($p < 0,001$). Contudo, houve interação do estado nutricional com a experiência em ambiente enriquecido. Os valores médios \pm desvios padrão da velocidade da DAC foram: N-AE, $2,72 \pm 0,22$ mm/min; H-AE, $2,54 \pm 0,23$ mm/min.

Adicionalmente, foi analisado o efeito do tratamento conjunto, isto é, OCV + AE nas distintas condições nutricionais. Observou-se redução da velocidade da DAC ($p < 0,05$) tanto nos animais nutridos, como nos hipernutridos. Contudo, esse efeito foi similar ao dos tratamentos isolados. Ou seja, não houve soma dos efeitos das variáveis investigadas. Os valores médios \pm desvio padrão da velocidade da DAC foram: N-OCV-AE, $3,04 \pm 0,19$ mm/min; H-OCV-AE, $2,75 \pm 0,21$ mm/min.

Os dados de velocidade de propagação da DAC estão apresentados na Figura 5 e registros representativos da variação lenta de voltagem que acompanha a DAC estão mostrados na Figura 6.

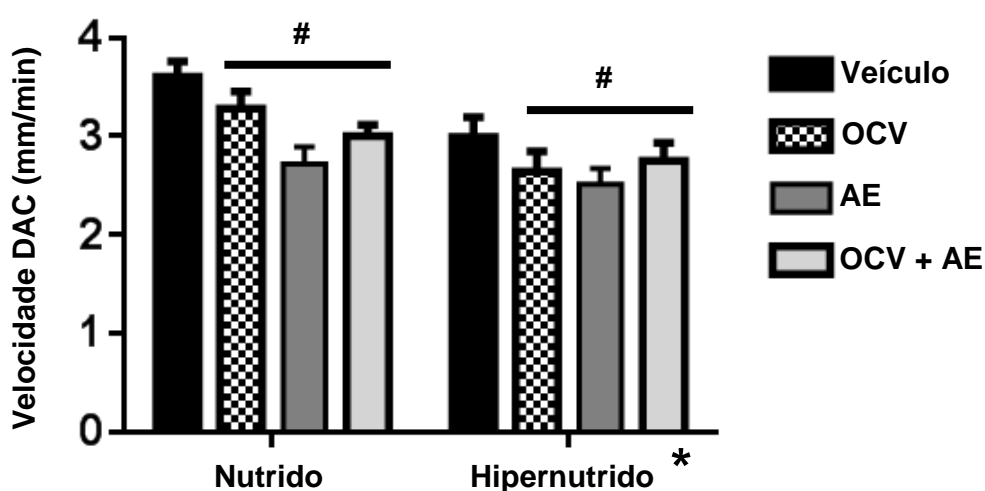


Figura 5 – Velocidade de propagação da DAC em ratos adultos, hipernutridos (H) durante o aleitamento. Os animais foram submetidos à suplementação com óleo de

coco extra virgem (OCV) ou veículo (V) e/ou a ambiente enriquecido (AE). Os dados são expressos em média \pm desvio padrão. O número de animais foi igual a sete em cada grupo. *indica diferença estatisticamente significativa entre os animais hipernutridos (H) e os respectivos nutridos (N). #representa $p < 0,05$ entre os ratos OCV e V ou entre aqueles AE e S/AE (ANOVA duas vias, seguida por Holm-Sidak).

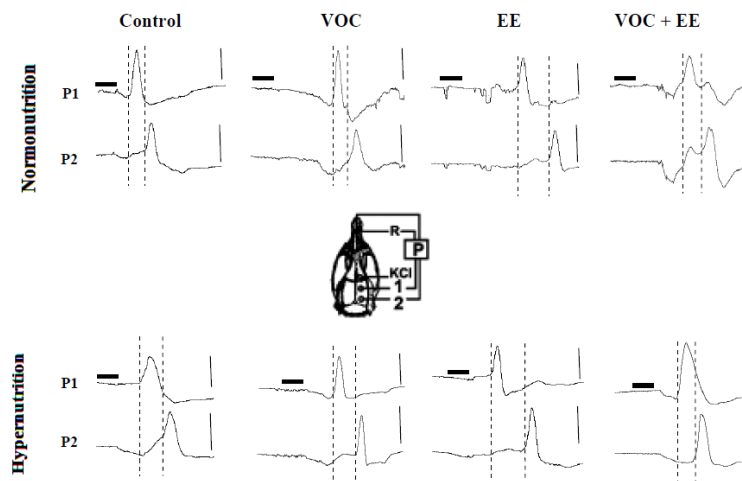


Figura 6: Registro eletrofisiológico (variação lenta de voltagem) da depressão alastrante cortical (DAC) em ratos nutridos (N) e hipernutridos (H) suplementados (por gavagem) com óleo de coco extra virgem (OCV) e/ou submetidos a ambiente enriquecido (AE). As barras verticais sólidas à direita indicam 10 mv (variação lenta negativa). As barras horizontais sob as linhas do registro P1 indicam o tempo (1 minuto) de estimulação com KCL 2% para deflagrar a DAC. Uma vez deflagrada no córtex frontal, a DAC foi registrada pelos dois eletrodos corticais localizados no córtex parietal (diagrama central - P1 e P2). Um terceiro eletrodo do mesmo tipo foi localizado nos ossos nasais e serviu como uma referência comum (R) para os eletrodos de registro. As linhas pontilhadas verticais indicam a latência de uma onda DAC cruzando a distância entre os dois eletrodos.

Nestas figuras, o grupo controle de cada condição nutricional (**Nutrido** ou **Hipernutrido**) corresponde aos animais suplementados com solução veículo e que não vivenciaram o ambiente enriquecido (S/AE). Assim, descritos na legenda como **Veículo**.

6.4. Estado oxidativo

No que se refere à avaliação da peroxidação lipídica no córtex cerebral dos animais, observou-se que a concentração de TBARS foi significativamente maior no grupo nutrido AE quando comparada ao seu controle N-S/AE ($p < 0,001$). Nas demais comparações, não houve diferença estatística na concentração de TBARS. A média \pm desvio padrão das concentrações de TBARS, em nmol de MDA/mg de proteína, foram: N-V-S/AE, $1,61 \pm 0,53$; N-V-AE, $2,33 \pm 0,43$; N-OCV-S/AE, $2,05 \pm 0,28$; N-OCV-AE, $2,15 \pm 0,32$; H-V-S/AE, $1,85 \pm 0,25$; H-V-AE, $1,94 \pm 0,31$; H-OCV-S/AE, $1,81 \pm 0,18$; H-OCV-AE, $1,95 \pm 0,31$. Esses dados estão apresentados na Figura 7.

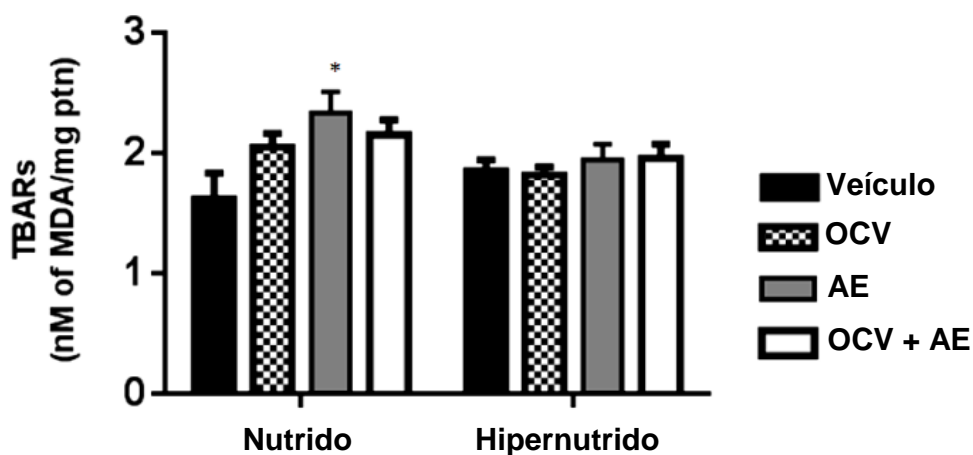


Figura 7 – Concentrações de TBARS (nmol of MDA/mg proteína) no córtex cerebral de ratos adultos, hipernutridos(H) durante o aleitamento. Os animais foram submetidos à suplementação com óleo de coco extra virgem (OCV) ou veículo (V) e/ou a ambiente enriquecido (AE). Os dados são expressos em média \pm desvio padrão. O número de animais variou de seis a sete em cada grupo. *indica diferença estatisticamente significativa entre os grupos nutridos (N) AE e S/AE (ANOVA duas vias, seguida por Holm-Sidak).

7. DISCUSSÃO

Neste estudo, pode-se observar que o tratamento precoce com OCV, bem como a vivência em AE reduziram a velocidade de propagação da DAC e este efeito ocorreu tanto nos animais nutridos, como nos hipernutridos. Contudo, a interação das duas intervenções, tratamento precoce com OCV e vivência no AE, não potencializou o efeito de redução da velocidade da DAC. Ademais, ambas as manipulações avaliadas não afetaram, de forma expressiva, os pesos corporal e encefálico, nem o estado oxidativo do córtex cerebral.

No que se refere aos parâmetros ponderais, a hipernutrição imposta no período de aleitamento induziu a um aumento do peso corporal que se manteve até a idade adulta. Houve também um aumento do peso encefálico úmido. Esses dados reforçam os achados de Rocha-de-Melo et al. (2006). É sabido que o período de aleitamento constitui uma das fases críticas do desenvolvimento do animal (MORGANE et al., 1993) e, de acordo com o paradigma da “Origem do Desenvolvimento da Saúde e da Doença”, a má nutrição no início da vida, incluindo a fase de lactação, aumenta o risco para o desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis na vida adulta (SUZUKI, 2017). Dessa forma, apesar de a sobrecarga nutricional ter sido imposta apenas no aleitamento, isto pode ter afetado a programação dos sistemas neuropeptidérgicos hipotalâmicos que regulam o peso corporal e o metabolismo até a vida adulta (PLAGEMANN et al., 2010).

A hipernutrição induzida pela redução do tamanho da ninhada durante a lactação culmina com alterações metabólicas que podem ser desenvolvidas durante a vida adulta. Ratos com excesso de peso apresentam alterações no pâncreas endócrino e grande predisposição ao desenvolvimento de diabetes tipo 2 (FISCHER et al., 2014). Estudo com mesmo modelo experimental para hipernutrição constatou que a supernutrição pós-natal precoce pode potencializar anormalidades estruturais e funcionais no envelhecimento do rim e pode levar à hipertensão sistólica com redução da atividade da renina intrarrenal (Yim et al., 2014). Tal insulto imposto precocemente provoca dano em vários sistemas, inclusive o sistema nervoso.

Em relação à excitabilidade cerebral, a susceptibilidade cortical ao fenômeno da depressão alastrante depende das condições em que se encontra o tecido cerebral.

O córtex pode se tornar mais vulnerável ao fenômeno, apresentando velocidades de propagação mais altas; ou mais resistente, com velocidades de propagação mais baixas (TANG et al., 2014). Dentre as condições que dificultam a propagação da depressão alastrante cortical pode-se mencionar o envelhecimento, o uso de anestésicos, o hipotireoidismo, dietas hiperlipídicas, a manipulação do sistema serotoninérgico através de dietas e de drogas. Por outro lado, a hipoglicemia, a privação de sono paradoxal, o tratamento com agonistas do ácido gama-amino-butírico, a desnutrição e dietas hipolipídicas facilitam a velocidade de propagação deste fenômeno (TANG et al., 2014).

No presente trabalho, o OCV tornou o cérebro mais resistente à propagação da DAC. Borba et al., 2010 verificaram redução da velocidade de propagação da DAC em ratos que ingeriam uma dieta normocalórica, mas que a fonte lipídica era proveniente exclusivamente do óleo de coco. Outro estudo *in vivo* identificou a capacidade do ácido caprílico, um dos componentes do óleo de coco, em atravessar a barreira hematocefálica, resultando em um efeito anticonvulsivo e neuroprotetor (FERNANDO et al, 2015). Ademais, em um estudo prospectivo, foi encontrado aprimoramento cognitivo de pacientes com doença neurodegenerativa que receberam um volume de 40 ml de óleo de coco (YANG et al, 2015). Todos esses achados sugerem que o óleo de coco pode exercer um efeito benéfico ao funcionamento do sistema nervoso.

Alguns mecanismos poderiam ser propostos para explicar essa ação antagônica da ingestão de OCV sobre a DAC. Um deles é que a administração do OCV ocorreu durante o período de aleitamento. Essa fase é marcada por uma intensa gliogênese (MORGANE et al., 1993) e as células da glia são as formadoras da bainha de mielina. Forte evidência demonstra que há uma relação inversa entre o nível de mielinização neuronal e a propagação da DAC (MERKLER et al., 2009). É possível que o OCV ofertado nesse período do desenvolvimento neuronal tenha favorecido a mielinização cortical. Contudo, estudos adicionais são necessários para confirmar essa hipótese. Esse mesmo mecanismo também poderia estar na base do efeito desacelerador da hipernutrição sobre a DAC. Vale ressaltar que, no presente trabalho, não houve apresentação de efeitos colaterais relacionados com a suplementação com óleo de coco.

Outro mecanismo que pode estar envolvido no efeito do OCV sobre a DAC seria devido ao possível papel antioxidante que lhe tem sido atribuído. Tem sido sugerido que os radicais livres medeiam o aumento da excitabilidade neuronal necessário para evocar a DAC (MALKOV et al., 2014). Além disso, a DAC *per se* induz a produção de espécies reativas de oxigênio no cérebro do rato (VIGGIANO et al., 2011). Dessa forma, estratégias que aumentam a defesa antioxidante do sistema nervoso podem dificultar a elicitação e/ou propagação do fenômeno. Estudos têm relatado ações de substâncias antioxidantes antagonizando a propagação da DAC, tais como a astaxantina (GUEDES; ABADIE-GUEDES; BEZERRA, 2012a; 2012b), o ácido ascórbico (MENDES-DA-SILVA et al., 2014). Assim, o OCV pode ter agido como um antioxidante no sistema nervoso central e dessa forma ter reduzido a sua excitabilidade. Via de ação semelhante também poderia ser atribuída ao efeito do AE sobre a DAC, haja vista ele favorecer mecanismos antioxidantes cerebrais (HERRING et al., 2010; MÁRMOL et al., 2015).

Tem sido mostrado que a estimulação cognitiva e física provocada pelo AE atenua processos pró-oxidativos e desencadeia mecanismos defesa antioxidativos (HERRING et al., 2010). Nesse estudo, Herring et al. detectaram diminuição de biomarcadores para espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, regulação negativa de mediadores pró-inflamatórios e pró-oxidativos e regulação positiva da SOD1 e SOD2. Apesar de os estudos sugerirem um efeito antioxidante do AE, no presente trabalho foi encontrado um aumento da peroxidação lipídica nos animais nutridos submetidos a essa condição.

Este resultado é insuficiente para afirmar de forma inequívoca que o AE provoca um aumento na peroxidação lipídica. Outras análises são necessárias para demonstrar que, de fato, houve aumento nos níveis de radicais livres no córtex cerebral desses animais. Entretanto, a maioria dos relatos descreve um efeito protetor do AE. Ele aperfeiçoa mecanismos de plasticidade dependentes da experiência, tais como a neurogênese adulta e a plasticidade sináptica (KANG et al., 2016). Em relação à depressão alastrante, Pusic et al. (2014) encontraram que o AE aumentava o limiar para a sua deflagração *in vitro*. Eles demonstraram que esse efeito estava relacionado com o aumento da expressão do fenótipo M2 da microglia que é induzido pelo AE.

Em suma, o presente trabalho reveste-se de relevância ao destacar intervenções acessíveis, que poderiam ser consideradas pela população brasileira, em especial aquela que é acometida por enfermidades graves que aumentam a excitabilidade do sistema nervoso.

8. CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo demonstraram que a suplementação com óleo de coco extra virgem (OCV) nas fases iniciais da vida, bem como a vivência em ambiente enriquecido desaceleram a propagação da depressão alastrante cortical (DAC) tanto em animais nutridos, como nos hipernutridos. Além disso, nenhuma das manipulações afeta os pesos corporal e encefálico.

A vivência em ambiente enriquecido aumenta a peroxidação lipídica no córtex cerebral dos animais nutridos, a julgar pelas concentrações mais altas das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs).

Os resultados obtidos também reforçam achados anteriores de que a hipernutrição durante o aleitamento aumenta os pesos corporal e encefálico, e reduz a excitabilidade cortical dos animais adultos.

Adicionalmente, os achados desse trabalho apresentam a possibilidade de alternativas não convencionais ou coadjuvantes serem usadas na terapia de patologias relacionadas à excitabilidade cerebral, como a epilepsia. É digno de nota mencionar que ambas as intervenções sugeridas nesse trabalho são acessíveis à população brasileira, nordestina.

REFERÊNCIAS

ABADIE-GUEDES, R.; GUEDES, R. C.; BEZERRA, R. S. The impairing effect of acute ethanol on spreading depression is antagonized by astaxanthin in rats of 2 young-adult ages. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 36, n. 9, p. 1563-7, 2012b.

ALVES, N. F. B.; PORPINO, S. K.; MONTEIRO, M. M.; GOMES, E. R.; BRAGA, V. A. Coconut oil supplementation and physical exercise improves baroreflex sensitivity and oxidative stress in hypertensive rats. **Applied Physiology Nutrition and Metabolism**, v.40, p.393-400, 2015.

BABU, A. S.; VELUSWAMY, S. K.; ARENA, R.; GUAZZI, M.; LAVIE, C. J. Virgin coconut oil and its potencial cardioprotective effects. **Postgraduate Medicine**, v.7, n. 126, p.76-83, 2014.

BEGUN, I. A. High-fat diet can postpone brain aging: a short review. **International Journal of Science and Research**, v.12, n.3, p.1-2, 2014.

BENDER, A. D. Over-nutrition: problems of overweight and obesity. **Oxford University Press**, 2014.

BHAGYA, V. R.; SRIKUMAR, B. N.; VEENA, J.; RAO, B. S. S. Short-term exposure to enriched environment rescues chronic stress-induced impaired hippocampal synaptic plasticity, anxiety, and memory deficits. **Journal of Neuroscience Research**, v.95, p.1602-10, 2017.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-54, 1976.

BORBA, J. M.; ROCHA-DE-MELO, A. P.; DOS SANTOS, A. A.; DA COSTA, B.L.; DA SILVA, R. P.; PASSOS, P. P. et al. Essential fatty acid deficiency reduces cortical depression propagation in rats: a two generation study. **Nutrition Neuroscience**, v.13, n.3, p.144-50, 2010.

CONCEIÇÃO, E. P. S.; FRANCO, J. G.; OLIVEIRA, E.; RESENDE, A. C.; AMARAL, T. A. S.; PEIXOTO-SILVA, N. et al. Oxidative stress programming in a rat model of postnatal early overnutrition - role of insulin resistance. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v.24, n.1, p.81-87, 2013.

COOPER, C. ; JAVAID, M. K.; TAYLOR, P.; WALKER-BONE, K.; DENNISON, E. ARDEN, N. The fetal origins of osteoporotic fracture. **Calcified Tissue International**, n.70, p.17-21, 2002.

CUI, Y.; KATAOKA, Y.; WATANABE, Y. **Role of cortical** spreading depression in the pathophysiology of migraine. **Neuroscience Bulletin**, v.5, n.30, p.812-22, 2014.

DAVIDOWA, H.; PLAGEMANN, A. Inhibition by insulin of hypothalamic VMN neurons in rats overweight due to postnatal overfeeding. **Neuroreport**, v.12, n.15, p. 3201-04, 2001.

DIAMOND, M. C. Response of the brain to enrichment. **International Journal of Interdisciplinary Education**, v.1, n.1, p.1-12, 2013.

ENGEL, R.; VINDEDAL, G. F.; HELM, P. J.; LOOGER, L. L.; TANG, W.; JENSEN, V. et al. Dynamics of ionic shifts in cortical spreading depression. **Cerebral Cortex**, p.1-8, 2015.

ENGEL, A. Eat and Death: Chronic Over-Eating. **Advance in Experimental Medicine and Biology**, v.960, p.53-80, 2017.

FERANIL, A. B.; DUAZO, P. L.; KUAZAWA, C. W.; ADAIR, L. S. Coconut oil is associated with a beneficial lipid profile in pre-menopausal women in the Philippines. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v.20, n.2, p.190-5, 2011.

FERNANDO, W. M. A. D. B.; MARTINS, I.J.; GOOZEE, K. G.; BRENANN, C. S.; JAYASENA, V.; MARTINS, R. N. The role of dietary coconut for the prevention and treatment of Alzheimer's disease: potential mechanisms of action. **Brazilian Journal of Nutrition**, 2015, v.114, n.1, p.1-14, 2015.

FISCHER, S. V.; CANCIAN, C. R. C.; MONTES, E. G.; LEITE, N. C.; GRASSIOLLI, S. Swimming training prevents metabolic imprinting induced by hypernutrition during lactation. **Clinical Nutrition ESPEN**, v.10, p.13-20, 2015.

FREEMAN, L. R.; ZANG, L.; NAIR, A.; DASURI, K.; FRANCIS, J.; FERNANDEZ-KIM, S. O. et al. Obesity increases cerebrocortical reactive oxygen species and impairs brain function. **Free Radical Biology and Medicine**, v.56, p.226-33, 2012.

GASIOR, M.; ROGAWSKI, M. A., HARTMAN, A. L. Neuroprotective and disease-modifying effects of the ketogenic diet. **Behav Pharmacology**, v.17, n.6, p.431-9, 2006.

GERMANO, P. C. P. S.; DE LIMA, S. D.; SOARES, G. S.; DOS SANTOS, A. A.; GUEDES, R. C. Hypercaloric high-lipid diet and brain development: Effects on cortical spreading depression in adult rats. **Nutritional Neuroscience**, v. 16, n.6, p.275-81, 2013.

GILGUN-SHERKI, Y.; MELAMED, E.; OFFEN, D. Neurodegenerative diseases induced by oxidative stress: the need for antioxidants that penetrate the blood-brain barrier. **Neurofarmacologia**, n.40 , p.959-75, 2001.

GUEDES, R. C. A. Cortical Spreading Depression: A Model for Studying Brain Consequences of Malnutrition. **Handbook of Behavior, Food and Nutrition**, p. 2343-55, 2011.

GUEDES, R. C.; ABADIE-GUEDES, R.; BEZERRA, R. S. The use of cortical spreading depression for studying the brain actions of antioxidants. **Nutrition Neuroscience**, v. 15, n. 3, p. 111-9, 2012a.

HABBOU, A.; LI, N.; ROCHETTE, L.; VERGELY, C. et al. Postnatal Overfeeding in Rodents by Litter Size Reduction Induces Major Short- and Long-Term Pathophysiological Consequences. **The Journal of Nutrition**, v.143, n.5, p.553-62, 2013.

HALPERIN, J. M.; HEALEY, D. M. The Influences of Environmental Enrichment, Cognitive Enhancement, and Physical Exercise on Brain Development: Can we Alter the Developmental Trajectory of ADHD? **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v.35, n.3, p.621-34, 2011.

HAWKES, C. A.; GENTLEMAN, S. M.; NICOLL, J. A.; CARARE, R. O. Prenatal high-fat diet alters the cerebrovasculature and clearance of β -amyloid in adult offspring. **Journal of Pathology**, v.235, n.4, p.619-31, 2015.

HEINDEL, J. J. Role of exposure to environmental chemicals in the developmental basis of disease and dysfunction. **Reproductive Toxicology**, n.23: p.257-9, 2007.

HERRING, A.; BLOME, M.; AMBRÉE, O.; SACHSER, N.; PAULUS, W.; KEYVANI, K. Reduction of cerebral oxidative stress following enriched environment in mice Alzheimer-like pathology. **Brain Pathology**, v.20, n.1, p.166-75, 2010.

HIRASE, H.; SHINOHARA, Y. Transformation of cortical and hippocampal neural circuit by environmental enrichment. **Neuroscience**, v.280, p.282-98, 2014.

INTAHPHUAK, S.; KHONSUNG, P.; PANTHOUNG, A. Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of virgin coconut oil. **Pharmaceutical Biology**, v.48, n.2, p. 151-7, 2010.

KANG, H.; CHOI, D. H.; LEE, J.; KIM, Y. J. Alteration of Energy Metabolism and Antioxidative Processing in the Hippocampus of Rats Reared in Long-Term Environmental Enrichment. **Developmental Neuroscience**, v.38, n.3, p.186-94, 2016.

LAW, K.S.; AZMAN, N.; OMAR, E. A.; MUSA, M. Y.; YOUSOFF, N. M.; SUCAIMAN, S. A. et al. The effects of virgin coconut oil (VCO) as supplementation on quality of life (QOL) among breast cancer patients. **Lipids in Health and Disease**, v.13, p. 139, 2014.

LIAU, K. M.; LEE, Y. Y.; CHEN, C.K.; RASOOL, A. H. G. An open-label pilot study of virgin coconut oil in reducing visceral adiposity. **ISRN Pharmacology**, v.2011, 2011.

MALKOV, A.; IVONOV, A. I.; POPOVA, I.; MUKHTAROV, M.; GUBKINA, O.; WASEEM, T. et al. Reactive oxygen species initiate a metabolic collapse in hippocampal slices: potential trigger of cortical spreading depression. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 34, n. 9, p. 1540-9, 2014.

MÁRMOL, F.; RODRIGUEZ, C. A.; SÁNCHEZ, J.; CHAMIZO, V. D. Anti-oxidative effects produced by environmental enrichment in the hippocampus and cerebral cortex of male and female rats. **Brain Research**, v. 1613, p.120-9, 2015.

MCCOMAS, A. J.; UPTON, A. R. M. Cortical spreading depression in migraine to reconsider? **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v.8, n.73, p.714-21, 2015.

MENDES-DA-SILVA, R. F.; LOPES-DE-MORAIS, A. A.; CAVALCANTI, G. A.; RODRIGUES, A. R.; ANDRADE-DE-COSTA, B. L. et al. Prooxidant *versus* antioxidant brain action of ascorbic acid in well-nourished and malnourished rats as a function of dose: A cortical spreading depression and malondialdehyde analysis. **Neuropharmacology**, v.86, p.155-60, 2014.

MEO, S.; REED, T. T.; VENDITTI, P.; VICTOR, V. M. Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v.2016, p.1-44, 2016.

MERKLER, D.; KLINKER, F.; JURGENS, T.; GLASER, R.; PAULUS, W.; BRINKMANN, B. G. et al. Propagation of Spreading Depression Inversely Correlates with Cortical Myelin Content. **Annals of Neurology**, v. 66, n. 3, p. 355-65, 2009.

MORGANE, P.J., AUSTIN-LAFRANCE, R.; BROZINO, J.; TONKISS, J.; DÍAZ-CINTRA, S.; CINTRA, L. et al. Prenatal malnutrition and development of the brain. **Neuroscience Behavior Review**, v.17, p.91-128, 1993.

MORRONE, C. D.; LIU, M.; BLACK, S. E.; MCLAURIN, J. A. Interaction between therapeutic interventions for Alzheimer's disease and physiological A β clearance mechanisms. **Frontiers Anging Neuroscience**, v.7, n.64, p.1-16, 2015.

NAFAR, F.; MEAROW, K. M. Coconut oil attenuates the effects of amyloid- β on cortical neurons in vitro. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 39, n. 2, p.233-7, 2014.

NEVIN, K. G.; RAJAMOHAN, T. Effect of topical application of virgin coconut oil on skin components and antioxidant status during dermal wound healing in young rats. **Skin Pharmacology and Physiology**, v.23, n.6, p. 290-7, 2010.

NITHIANANTHARAJAH, J.; HANNAN, A. J. Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of nervous system. **Nature Reviews Neuroscience**, n.7, p.697-709, 2006.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal Biochem.**, v.95, p.351-8, 1979.

ORTIZ, G. G.; PACHECO, F. P. M.; MIRELES-RAMÍREZ, M.; FLORES-ALVARADO, L. J.; GONZÁLEZ-USIGLI, H.; SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, V. J. et al. Oxidative Stress: Love and Hate History in Central Nervous System. **Advances in Protein Chemistry and Structural Biology**, v.108, p. 1-31, 2017.

PARKS, NAOMI. "What Is Overnutrition and Undernutrition?" **Livestrong**, 2012.

PLAGEMANN, A.; ROEPKE, K.; HARDER, T.; BRUNN, M.; HARDER, A.; WITTROCK-STAAART, M. et al. Epigenetic malprogramming of the insulin receptor promoter due to developmental overfeeding. **Journal of Perinatal Medicine**, v.38, n.4, p.393-400, 2010.

PUJALTE, G. G. A.; AHANOGBE, I.; THURSTON, M. J.; WHITE, R. O.; ROCHE-GREEN, A. Addressing Pediatric Obesity in Clinic. **Global Pediatric Health**, 2017.

PUSIC, K. M.; PUSIC, A. D.; KEMME, J.; KRAIG, R. P. Spreading depression requires microglia and is decreased by their M2a polarization from environmental enrichment. **Glia**, v.62, n.7, p.1176-94, 2014.

RANI, V.; DEEP, G; SINGH, R. K.; PALLE, K.; YADAV, U. C. S. Oxidative stress and metabolic disorders: pathogenesis and therapeutic strategies. **Life Sciences**, v.148, p.183-93, 2016.

REGE, S. D.; KUMAR, S.; WILSON, D. N.; TAMURA, L.; GEETHA, T.; MATHEWS, S. T. et al. Resveratrol protects the brain of obese mice from oxidative damage. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v.2013, 2013.

ROCHA-DE-MELO, A. P.; PICANÇO-DINIZ, C. W.; BORBA, J. M. C.; SANTOS-MONTEIRO, J.; GUEDES, R. C. A. NADPH-diaphorase Histochemical Labeling Patterns in the Hippocampal Neuropil and Visual Cortical Neurons in Weaned Rats Reared during Lactation on Different Litter Sizes. **Nutritional Neuroscience**, n.4, v.7, p.207-16, 2004.

ROCHA-DE-MELO, A. P.; CAVALCANTI, J. B.; BARROS, A. S.; GUEDES, R. C. Manipulation of rat litter size during suckling influences cortical spreading depression after weaning and at adulthood. **Nutritional Neuroscience**, n.9, v.3/4, p1.55-160, 2006.

SAMPEDRO-PIQUERO, P.; ZANCADA-MENENDEZ, C.; BEGEGA, A.; RUBIO, S.; ARIAS, J. L. Effects of environmental enrichment on anxiety responses, spatial memory and cytochrome c oxidase activity in adult rats. **BrainResearch Bulletin**, v.98, p.1-9, 2013.

SARRAFCHI, A.; MAHMOUD, B.; HEDAYATOLLAH, S.; MAHMOUD, R. K. Oxidative stress and Parkinson's disease: new hope in treatment with plant-based antioxidants. **Current pharmaceutical design**, v.22, n.2, p.238-46, 2016.

SCHNEIDER, M. O.; FURIAN, F. A.; FREIRE, L. F. R.; FIGHERA, R. M.; DE CARVALHO, M. J.; FIORENZA, G. N. et al. Ascorbate modulates pentylene-tetrazol-induced convulsions biphasically. **Neuroscience**, v.128, n.4, p.721-8, 2004.

SHILLING, M.; MATT, L.; RUBIN, E.; VISITACION, M. P.; HALLER, N. A.; GREY, S. F. et al. Antimicrobial effects of virgin coconut oil and its medium-chain fatty acids on *Clostridium difficile*. **Journal of Medicinal Food**, p.1079-85, 2013.

SIES, H.; BERNDT, C.; JONES, D. P. Oxidative stress. **Annual Review of Biochemical**, n.86, p.715-48, 2017.

STAMENKOVIC, V.; STAMENKOVIC, S.; JAWORSKI, T.; GAWLAK, M.; JOVANOVIC, M.; JAKOVCEVSKI, I. et al. The extracellular matrix glycoprotein tenascin-C and matrix metalloproteinases modify cerebellar structural plasticity by exposure to an enriched environment. **Brain Structure and Function**, v.222, p. 393-415, 2017.

SUZUKI, K. The developing world of DOHaD. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, p.1-4, 2017.

TANG, Y. T.; MENDEZ, J. M.; THERIOT, J. J.; SAWANT, P. M.; LÓPEZ-VALDES, H. E.; JU, Y. S. et al. Minimum conditions for the induction of cortical spreading depression in brain slices. **Journal of Neurophysiology**, v.112, n.10, p.2572-9, 2014.

VIGGIANO, A.; VIGGIANO, E.; VALENTINO, I.; MONDA, M.; VIGGIANO, A.; DE LUCA, B. Cortical spreading depression affects reactive oxygen species production. **Brain Research**, v. 1368, p. 11-8, 2011.

VIGGIANO, E.; MONDA, V.; MESSINA, A.; MOSCATELLI, F.; VALENZANO, A.; TAFURI, D. et al. Cortical spreading depression produces a neuroprotective effect activating mitochondrial uncoupling protein-5. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v.12, p.1705-10, 2016.

VYSAKH, A.; RATHEESH, M.; RAIMOHANAN, T. P.; PRAMOD, C.; PREMIAL, S.; KUMER, G. B. et al. Polyphenolics isolated from virgin coconut oil inhibits adjuvant induced arthritis in rats through antioxidant and anti-inflammatory action. **International Immunopharmacology**, v.20, n.1, p.124-30, 2014.

YANG, H.; ORTI, R. O. J. E.; SEBATER, S. P.; CASTILLO, S. S.; ROCHINA, M. J.; RAMÓN, M. N. et al. Coconut oil: non-alternative drug treatment against Alzheimer disease. **Nutrición Hospitalaria**, v.32, n.6, p.2822-7, 2015.

YEAP, S. K.; BEH, B. K.; ALI, N. M.; YOUSOF, H. M.; HO, W. Y.; KOH, S. P. et al. Antistress and antioxidant effects of virgin coconut oil in vivo. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v.9, n.1, p.39-42, 2015.

YIM, H. E.; YOO, K. H.; BAE, I. S.; LEE, J. W. Postnatal early overnutrition causes long-term renal decline in aging male rats. **Pediatric Research**, v.75, p.259-65, 2014.

ZACARIA, Z. A.; ROFIEE, M. S.; SOMCHIT, M. N.; ZURAINI, A.; SULAIMAN, M. R.; TEH, L. K. et al. Hepatoprotective Activity of Dried- and Fermented-Processed Virgin Coconut Oil. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, p.1-8, 2011.

ZHU, X.; WANG, F.; HU, H.; SUN, X.; KILGARD, M. P.; MERZENICH, M. M. et al. Environmental Acoustic Enrichment Promotes Recovery from Developmentally Degraded Auditory Cortical Processing. **The Journal of Neuroscience**, v.34, n.16, p.5406-15, 2014.

ANEXO - Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais da UFPE



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br

Recife, 11 de novembro de 2015.

Ofício nº 118/14

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: **Prof.ª Manuella Batista de Oliveira Hornsby**

Departamento de Nutrição

Centro de Ciências da Saúde

Universidade Federal de Pernambuco

Processo nº 23076.048535/2015-78

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, **"Influência da suplementação com óleo de coco virgem e do ambiente enriquecido sobre ansiedade e memória em ratos submetidos à ingestão alimentar excessiva no período de lactação"**.

Concluimos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.


Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais a serem realizados.

Origem dos animais: Biotério do Departamento de Nutrição – CCS/UFPE; Animais: ratos; Linhagem; *Wistar*; Sexo: machos; Idade; 7-60 dias; peso: 15-300g; Número total de animais previsto no protocolo: 60.

Atenciosamente,

RECEBIDO EM: / /
NOME:
ASSINATURA:

 Prof. Dr. Pedro V. Carelli
Presidente da CEUA / CCS - UFPE
SIAPE 1801584