



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA- *CAMPUS* DE SOBRAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

ANA BRUNA DE ARAÚJO

**ESTUDO DOS EFEITOS DA FUCOIDANA SOZINHA OU EM ASSOCIAÇÃO COM
O ÁCIDO VALPRÓICO NO MODELO DE CONVULSÃO INDUZIDO POR
PILOCARPINA EM CAMUNDONGOS**

SOBRAL

2016

ANA BRUNA DE ARAÚJO

ESTUDO DOS EFEITOS DA FUCOIDANA SOZINHA OU EM ASSOCIAÇÃO COM O
ÁCIDO VALPRÓICO NO MODELO DE CONVULSÃO INDUZIDO POR PILOCARPINA
EM CAMUNDONGOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador(a): Profa. Dra. Norma Maria Barros Benevides.

Co-orientador(a): Profa. Dra. Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar.

SOBRAL

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

A687e Araújo, Ana Bruna de.

Estudo dos efeitos da fucoidana sozinha ou em associação com o ácido valproico no modelo de convulsão induzido por pilocarpina em camundongos / Ana Bruna de Araújo. – 2016.
69 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Campus de Sobral, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Sobral, 2016.

Orientação: Profa. Dra. Norma Maria Barros Benevides.

Coorientação: Profa. Dra. Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar.

1. Fucoidana. 2. Pilocarpina. 3. Ácido valproico. 4. Convulsão. 5. Antioxidante. I. Título.

CDD 660.6

ANA BRUNA DE ARAÚJO

ESTUDO DOS EFEITOS DA FUCOIDANA SOZINHA OU EM ASSOCIAÇÃO COM O
ÁCIDO VALPRÓICO NO MODELO DE CONVULSÃO INDUZIDO POR PILOCARPINA
EM CAMUNDONGOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.
Orientador(a): Profa. Norma Maria Barros Benevides.
Co-orientador(a): Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar.

Aprovado em: 14/07/2016

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Norma Maria Barros Benevides (Orientador).
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar
Universidade Federal do Ceará (UFC) – *campus* Sobral

Profa. Dra. Carla Thiciane Vasconcelos de Melo
Universidade Federal do Ceará (UFC)– *Campus* Sobral

Prof. Dr. Tiago Sousa de Melo
Instituto Superior de Teologia aplicada (INTA)

A Deus, minha fortaleza.

Aos meus pais, Ana Betânia Vasconcelos
Araújo e Gonçalo José de Araújo pelo carinho
e dedicação.

AGRADECIMENTOS

À Deus minha fortaleza, por sempre me guiar na minha caminhada, permitindo que eu faça as melhores escolhas sempre.

À profa. Dra. Norma Maria Barros Benevides, pela contribuição na orientação do trabalho e participação na banca de defesa.

À profa. Dra. Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar minha co-orientadora e alguém que admiro muito. Muito obrigada pela compreensão, carinho, apoio, exemplo e amizade.

À Suéli Maria Carneiro Prado pela valiosa ajuda na realização deste trabalho, além da amizade, confiança e companheirismo. Pessoa admirável pela competência e dedicação profissional.

À Maria Isabel Linhares pela grandiosa ajuda nos experimentos, além da amizade, confiança e companheirismo. Obrigada pela sua amizade e carinho.

À Débora Patrícia Feitosa Medeiros pela ajuda na realização dos experimentos, amizade e carinho.

Aos meus pais Gonçalo José de Araújo e Ana Betânia Vasconcelos de Araújo pelo incentivo em meus estudos, carinho, amor e dedicação.

Aos meus irmãos Gonçalo e Beatriz e ao meu sobrinho Neurimar Filho pelo carinho, amor e dedicação.

Ao meu namorado Bruno Bezerra Carneiro, pela grandiosa ajuda nos experimentos, pelo apoio constante durante a realização deste trabalho, pela dedicação, incentivo no crescimento pessoal, pelo carinho e amor.

Aos amigos de laboratório Tarcizio, Thomas, Emanuella, Larissa, Dhone, Nayane e Paulo pela ajuda nos experimentos e pela amizade.

Aos meus grandes amigos Lidiane, Sabrina, Rosilane, Elano, Mirian, pela amizade, carinho e por momentos felizes compartilhados juntos.

Aos colegas de mestrado Suéli, Aline, Elionai, Flávia, Humberlânia, Suellen, Isrrael e Glaucinete, pelos momentos felizes vivido juntos durante a realização das disciplinas e durante os dois anos de mestrado.

À universidade Federal do Ceará, pela disposição da infraestrutura para realização dos experimentos.

Aos funcionários da Faculdade de medicina *campus*-Sobral, em especial Araújo, Almino, Antônio, Bruno, Paulo e José pela dedicação ao trabalho.

À técnica Jordânia e veterinária Alana, pela dedicação ao trabalho.

À secretária do curso de Pós-graduação em Biotecnologia: Edilda, pela dedicação e paciência com os alunos.

Aos *camundongos*, pois sem eles não existiria este trabalho.

À CAPES, pelo apoio financeiro, essencial para a realização desse trabalho.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis”.

(José de Alencar)

RESUMO

A epilepsia é um dos transtornos cerebrais mais frequentes na população geral, afetando cerca de 1% da população mundial. A convulsão pode causar danos neuronais, inclusive morte de neurônios e os mecanismos fisiopatológicos envolvidos nesse processo ainda não estão bem esclarecidos. Sabe-se que a atividade convulsiva está associada a mudanças bioquímicas em algumas áreas cerebrais e afeta diversos neurotransmissores, o metabolismo dos carboidratos, os sistemas de segundos mensageiros e a expressão gênica. Entre as mudanças bioquímicas envolvidas, está o aumento do estresse oxidativo que pode alterar dramaticamente a função celular estando diretamente relacionado com a morte neuronal induzida pela convulsão. Portanto, agentes antioxidantes exógenos poderiam reduzir o estresse oxidativo e consequentemente os danos neuronais, agindo inclusive como adjuvantes no tratamento farmacológico convencional. A fucoïdana é um polissacarídeo sulfatado cujo principal componente é a fucose, extraída a partir de algas pardas. A literatura tem demonstrado que a fucoïdana apresenta potentes atividades antioxidante e anti-inflamatória em vários modelos experimentais. O presente estudo tem como objetivo avaliar os efeitos da fucoïdana sozinha ou em associação com o ácido valpróico via mecanismos antioxidativos no modelo de convulsão induzida por pilocarpina em camundongos. Os animais, (camundongos), *Swiss*, adultos, machos, (25-30 g) receberam injeção de fucoïdana (FUCO 7,5, 15 e 30 mg/kg, i.p.), ácido valpróico (AVP 100, 200 e 400 mg/kg, i.p.), ácido valpróico + fucoïdana (AVP100+FUCO7,5) ou solução salina (i.p.) durante quatorze dias. Após 30 minutos da última injeção das drogas em estudo ou veículo, foi administrada pilocarpina na dose de 400 mg/kg i.p., depois os animais foram submetidos aos testes comportamentais e em seguida foram sacrificados e seus cérebros dissecados para a realização das análises neuroquímicas. O pré-tratamento com FUCO durante 14 dias nas maiores doses aumentou a latência de convulsão e a latência de morte. Não foi observado nenhum efeito significativo com a dose de 7,5 mg/kg nesses parâmetros, o mesmo ocorreu com o AVP na dose de 100 mg/kg. Entretanto, a associação FUCO+AVP reduziu a latência de convulsão em 52% e a latência de morte em 67%. Foi verificado aumento na concentração de MDA no hipocampo dos animais tratados com salina+PILO (67%) e esse efeito foi prevenido com o pré-tratamento com fucoïdana nas doses de 15 e 30 mg/kg (37 e 30% respectivamente). A associação da FUCO 7,5 mg/kg+AVP de 100 mg/kg promoveu diminuição em cerca de 45% na concentração de MDA quando comparado com o controle. Foi verificado aumento significativo na concentração de nitrito/nitrato no hipocampo dos animais tratados com salina+PILO (65%). O pré-tratamento com fucoïdana nas doses de 7,5, 15 e 30 mg/kg, preveniu esse aumento. A associação AVP100 + FUCO7,5 também recuperou os níveis de MDA. A pilocarpina provocou redução dos níveis de GSH, que foram recuperados com o tratamento com associação FUCO+AVP. Nossos resultados sugerem que a fucoïdana parece ser uma alternativa para o tratamento da epilepsia quando associado ao ácido valpróico, pois aumenta a neuroproteção permitindo a redução da dose do AVP e, portanto, dos seus efeitos colaterais.

Palavras-chave: Fucoïdana, pilocarpina, ácido valpróico, convulsão, antioxidante

ABSTRAT

Epilepsy is one of the most common brain disorders, affecting about 1% of the world population. Seizures can cause neuronal damage, including death of neurons and the pathophysiological mechanisms involved in this process are still unclear. It is known that the seizure activity is associated with biochemical changes in some brain areas and affects several neurotransmitters, carbohydrate metabolism, the second messenger systems and gene expression. Among the biochemical changes involved, there is the increased oxidative stress that can dramatically alter cellular function, being directly related to neuronal death induced by seizure. In this context, exogenous antioxidants may have the ability to reduce oxidative stress and hence neuronal injury, acting also as adjuvants in conventional pharmacological treatment. Fucoidan is a sulfated polysaccharide whose main component is the fucose extracted from brown algae. The literature has shown that fucoidan demonstrates potent antioxidant and anti-inflammatory activities in various experimental models. This study aims to evaluate the effects of fucoidan alone or in combination with valproic acid via antioxidative mechanisms in the pilocarpine model of seizure in mice. The animals (adult male Swiss mice, 25-30g) were treated with fucoidan injection (FUCO 7.5, 15 and 30 mg/kg, i.p.), valproic acid (VPA 100, 200 and 400 mg/kg, i.p.), valproic acid + fucoidan (VPA100 + FUCO7,5) or saline (i.p.) for fourteen days. Thirty minutes after the last injection of drug or vehicle, pilocarpine in the dose of 400mg / kg was administered i.p. Next, the animals were subjected to behavioral testing and then sacrificed and had their brains dissected for further neurochemical analyzes. Pretreatment with FUCO for 14 days in higher doses increased the latency to seizures onset and latency of death. There was no significant effect at a dose of 7.5 mg/kg in these parameters, the same happened to VPA at a dose of 100 mg/kg. However, FUCO+VPA association reduces the latency of seizure onset by 52% and the latency of death by 67%. Increase was observed in MDA concentration in the hippocampus of animals treated with saline+PILO (67%) and this effect was prevented by pretreatment with fucoidan at doses of 15 and 30 mg/kg. The association of FUCO 7.5 mg/kg+VPA 100 mg/kg caused a decrease by about 45% of the MDA concentration compared with control. It was observed a significant increase in the concentration of nitrite/nitrate in the hippocampus of animals treated with saline+PILO (65%). Pretreatment with fucoidan at doses of 7.5, 15 and 30 mg/kg, prevented this increase. The association FUCO+VPA also recovered MDA levels. Pilocarpine caused a reduction in GSH levels, which were recovered by treatment with FUCO+PVA association. The results of this work suggest that fucoidan seems to be an alternative for the treatment of epilepsy when combined with valproic acid as it increases neuroprotection allowing the reduction of VPA doses and therefore, its side effects.

Keywords: Fucoidan, pilocarpine, valproic acid, seizure, antioxidant

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Efeito da Fucoïdana nas doses de 7,5, 15 e 30 mg/Kg sobre a latência de convulsão no teste de Convulsão Induzida por Pilocarpina em camundongos..... 34
- Figura 2- Efeito da Fucoïdana nas doses de 7,5, 15 e 30 mg/Kg sobre a latência de morte no teste de Convulsão Induzida por Pilocarpina em camundongos..... 35
- Figura 3- Efeito do ácido valpróico nas doses de 100, 200 e 400 mg/Kg sobre a latência de convulsão no teste de Convulsão Induzida por Pilocarpina em camundongos..... 37
- Figura 4- Efeito do ácido valpróico nas doses de 100, 200 e 400 mg/Kg sobre a latência de morte no teste de Convulsão Induzida por Pilocarpina em camundongos..... 38
- Figura 5- Efeito da associação de ácido valpróico na dose de 100 mg/Kg e fucoïdana na dose de 7,5 mg/Kg (AVP+FUCO7,5, i.p.) sobre a latência de convulsão no teste de Convulsão Induzida por Pilocarpina em camundongos..... 40
- Figura 6- Efeito da associação de ácido valpróico na dose de 100 mg/Kg e fucoïdana na dose de 7,5 mg/Kg (AVP+FUCO7,5, i.p.) sobre a latência de morte no teste de Convulsão Induzida por Pilocarpina em camundongos..... 41
- Figura 7- Efeito do tratamento com FUCO sozinha e/ou em associação com AVP sobre a produção de substâncias ácidas reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) em hipocampo de camundongos tratados com P400..... 44
- Figura 8- Efeito do tratamento com FUCO sozinha e/ou em associação com AVP sobre a produção de substâncias ácidas reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) em córtex pré-frontal de camundongos tratados com P400..... 45
- Figura 9- Efeito do tratamento com FUCO sozinha e/ou em associação com AVP

	sobre a produção de substâncias ácidas reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) em corpo estriado de camundongos tratados com P400.....	46
Figura 10-	Efeitos do tratamento com Fucoïdana sozinha e/ou em associação com ácido valpróico sobre a produção de nitrito e nitrato em hipocampo de camundongos submetidos à convulsão com Pilocarpina.....	49
Figura 11-	Efeitos do tratamento com Fucoïdana e/ou em associação com ácido valpróico sobre a produção de nitrito e nitrato em córtex pré-frontal de camundongos submetidos à convulsão com Pilocarpina.....	50
Figura 12-	Efeitos do tratamento com Fucoïdana e/ou em associação com ácido valpróico sobre a produção de nitrito e nitrato em corpo estriado de camundongo submetidos a convulsão com Pilocarpina.....	51
Figura 13-	Efeitos do tratamento com Fucoïdana e/ou em associação com ácido valpróico sobre a produção de nitrito e nitrato em hipocampo de camundongos submetidos à convulsão com Pilocarpina.....	53
Figura 14-	Efeitos do tratamento com Fucoïdana e/ou em associação com ácido valpróico sobre a produção de nitrito e nitrato em córtex pré-frontal de camundongos submetidos à convulsão com Pilocarpina.....	54
Figura 15-	Efeitos do tratamento com Fucoïdana e/ou em associação com ácido valpróico sobre a produção de nitrito e nitrato em corpo estriado de camundongos submetidos à convulsão com Pilocarpina.....	55

LISTA QUADROS E TABELAS

Quadro 1 - Drogas utilizadas nos experimentos.....	28
Quadro 2 - Protocolo de tratamento Experimental.....	29
Tabela 1 - Parâmetros Comportamentais Observados.....	30

LISTA DE ABREVIACÕES

ACh	Acetilcolina
AVP	cido Valpróico
CFP	Córtex Pré-frontal
CE	Corpo Estriado
DAEs	Drogas antiepilépticas
DTNB	5,5'-ditiobis- ácido 2-nitrobenzóico
ELISA	Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay
EROs	Espécies Reativas de Oxignio
ERNs	Espécies Reativas de Nitrogênio
FUCO	Fucoidana
GABA	cido gama-aminobutírico
GSH	Glutaciona reduzida
HC	Hipocampo
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
iNOS	óxido nítrico sintase induzida
MDA	Malonildialdedo ou malondialdeido
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
NA	Noradrenalina
NaCl	Solução salina
NO	xido Ntrico
OH	Radical hidroxila
OMS	Organização Mundial da saude
ONOOH	Peroxinitrito
PILO	Pilocarpina
RCM	Receptores muscarínicos
SOD	uperxido dismutase
SNC	Sistema Nervoso Central
TH	Tirosina hidroxilase
TBARS	cido tiobarbitúrico
5-HT	Serotonina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Epilepsia.....	15
1.2 Drogas antiepilépticas	16
1.3 Vantagem da terapia combinada.....	18
1.4 Modelos animais de epilepsia.....	18
1.5 Epilepsia e o estresse oxidativo.....	20
1.6 Antioxidantes.....	21
1.7 Polissacarídeos extraídos de algas pardas.....	23
1.7.1 Atividade antioxidante e anti-inflamatória de fucoidana.....	24
2 OBJETIVOS.....	26
2.1 Geral.....	26
2.2 Específicos.....	26
3 METODOLOGIA.....	27
3.1 Animais.....	27
3.2 Aspectos éticos.....	27
3.3 Drogas utilizadas.....	27
3.4 Protocolo de tratamento dos grupos experimentais.....	27
3.5 Estudo comportamental.....	28
3.5.1 Alterações comportamentais após indução de convulsão e estado epiléptico por admistração de pilocarpina.....	28
3.6 Dissecção das áreas cerebrais.....	29
3.7 Determinação do estresse oxidativo.....	29
3.7.1 Determinação da peroxidação lipídica.....	29
3.7.2 Determinação da concentração de nitrito/nitrato.....	30
3.7.3 Determinação da concentração de glutaciona reduzida.....	31
4 Análise estatística.....	31
5 RESULTADOS.....	32
5.1 Estudo comportamental.....	32

5.1.1 Teste da Convulsão Induzida por Pilocarpina em camundongos tratados ou não com Fucoïdana (FUCO) nas doses de 7,5, 15 e 30 mg/Kg.....	32
5.1.2 Teste da Convulsão Induzida por Pilocarpina em camundongos tratados ou não com ácido valpróico (AVP) nas doses de 100, 200 e 400 mg/Kg.....	35
5.1.3 Teste da Convulsão Induzida por Pilocarpina em camundongos tratados ou não com a associação de ácido valpróico 100 mg/Kg e Fucoïdana 7,5 mg/Kg (AVP100+FUCO7,5).....	38
5.2 Determinação da atividade antioxidante do pré-tratamento com fucoïdana e/ou ácido valpróico no modelo de convulsão induzida por pilocarpina.....	41
5.2.1 Pré-tratamento com fucoïdana sozinha e/ou em associação com ácido valpróico sobre a produção de substâncias ácidas reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em áreas cerebrais de camundongos submetidos ao modelo de convulsão induzido por pilocarpina.....	41
5.2.2 Pré-tratamento com fucoïdana sozinha e/ou em associação com ácido valpróico sobre a concentração de nitrito/nitrato nas áreas cerebrais de camundongos submetidos ao modelo de convulsão induzido por pilocarpina.....	46
5.2.3 Efeitos do pré-tratamento com fucoïdana sozinha e/ou em associação com ácido valpróico sobre a concentração de glutathiona reduzida nas áreas cerebrais de camundongos submetidos ao modelo de convulsão induzido por pilocarpina.....	51
6 DISCUSSÃO.....	55
7 CONCLUSÃO.....	60
REFERÊNCIAS.....	61

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epilepsia

A epilepsia é um dos principais transtornos neurológicos com ampla distribuição, desconhecendo idade, raça, padrão social ou limites geográficos (SILVA *et al.*, 2014), afetando cerca de 50 milhões de pessoas em todo o mundo, de acordo com os dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) (TUTANC *et al.*, 2015; OMS, 2006). No mundo, existem cerca de 2,4 milhões de novos pacientes epiléticos cada ano, dos quais, pelo menos, 50% começam na infância e adolescência (TUTANC *et al.*, 2015). É válido ressaltar que no Brasil a epilepsia na infância apresenta uma variação na prevalência de 11,9 a 21,0 por 1000 crianças, apresentando taxas semelhantes as apresentadas em outros países em desenvolvimento (LONGATO, 2015).

A epilepsia é caracterizada por crises espontâneas e recorrentes causadas por alterações paroxísticas focais ou generalizadas nas funções neurológicas desencadeadas por atividade elétrica anormal, acometendo uma ou várias áreas do córtex cerebral e podem ser causadas por inúmeras patologias estruturais ou neuroquímicas (SILVA *et al.*, 2014). Sabe-se que a atividade epilética baseia-se no desequilíbrio inibitório-excitatório do tecido neural. O estudo dos mecanismos da epilepsia tem sido focado nas alterações da atividade de aminoácidos inibitório (ácido γ -aminobutírico - GABA) e excitatório (glutamato e aspartato) (KOSHAL; KUMAR, 2016).

As crises epiléticas causam efeitos graves e duradouros sobre a arquitetura do cérebro, levando a morte neuronal celular. As epilepsias podem resultar de um conjunto de mudanças bioquímicas no cérebro, que afetam a liberação e transporte dos neurotransmissores, as propriedades dos canais iônicos e dos receptores, a regulação da expressão de genes, a reorganização sináptica e a atividade dos astrócitos (PAREDES, 2008). Entre as mudanças bioquímicas envolvidas, está o aumento do estresse oxidativo que pode alterar dramaticamente a função celular e modificar a liberação e/ou síntese de outros compostos, estando diretamente relacionado com a morte neuronal induzida pela convulsão (FRANTSEVA *et al.*, 2000; SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004; WALTZ *et al.*, 2000).

Atualmente sabe-se que as causas da epilepsia compreendem a predisposição genética, lesões cerebrais, intoxicação e tumores (OLIVEIRA, 2010). Estimativas sugerem que cerca de 80% dos casos de epilepsia ocorrem em países em desenvolvimento, onde se encontra um

número maior de pessoas desnutridas, doenças infecciosas e deficiência no atendimento médico, sabendo que um grande número de pacientes permanece sem o tratamento adequado (MEGIDDO *et al.*, 2016).

Sabe-se que cerca de 80% dos 50 milhões de pessoas no mundo que têm epilepsia vivem em baixa e média renda. Num país como a Índia estima-se que de 6-10 milhões de pessoas vivem com epilepsia ativa, mas menos da metade recebe tratamento adequado e suficiente (MEGIDDO *et al.*, 2016). No Brasil há poucos dados epidemiológicos disponíveis. Um estudo realizado por Costa e colaboradores em Porto Alegre, estimaram que 0,2 a 2% da população devem apresentar uma ou mais crises durante a vida. Em outro estudo realizado na cidade de São Paulo mostrou uma prevalência de 1,19%. Em países onde as pessoas vivem com melhores condições econômicas e sociais, novos casos são de 30 a 50 por 100.000 pessoas na população em geral. Em relação aos países com baixa e média renda, este número pode ser até duas vezes maior (SILVA, 2015; NETO; MARCHETTI, 2005).

Pesquisadores buscam descobrir drogas que sejam capazes de diminuir as frequências e propagação das manifestações epilépticas. Muitas drogas já foram descobertas com essa finalidade, mas 30% dos pacientes não apresentam boa resposta ou apresentam efeito adverso severo às drogas disponíveis (WAHAB, 2010).

1.2 Drogas antiepilépticas

As DAEs são utilizadas no tratamento da epilepsia desde 1857, quando Locock usou sal de brometo com resultados positivos em mulheres com epilepsia catamenial. Desde então, inúmeros medicamentos foram introduzidos na prática clínica para o tratamento dos mais diversos tipos de epilepsia. Em 1912, a descoberta do fenobarbital marcou o início da farmacoterapia moderna da epilepsia. Depois de 70 anos, a fenitoína, carbamazepina, valproato de sódio e uma série de benzodiazepínicos tornaram-se disponíveis e efetivaram-se como drogas antiepilépticas consagradas no mercado (BRODIE, DICHTER, 1996).

Os mecanismos de ação das DAEs comercializadas ainda não são completamente entendidos, mas de modo geral, envolvem alteração no balanço entre excitação e inibição neuronal. Em nível celular, são conhecidos três mecanismos básicos: modulação de canais iônicos dependentes de voltagem (Na^+ , Ca^{++} , K^+); aumento da neurotransmissão inibitória mediada pelo GABA; e atenuação da neurotransmissão excitatória, particularmente mediada

pelo glutamato (CZAPINSKI *et al.*, 2005; LASON *et al.*, 2014; WHITE, SMITH, WILCOX, 2007).

O ácido valpróico (AVP), um ácido graxo de cadeia curta ramificado, tem inúmeros mecanismos de ação que o torna uma droga antiepiléptica de amplo espectro e um dos medicamentos mais prescritos para epilepsia em todo o mundo. Seu mecanismo de ação é através da ação no sistema inibitório GABA, através do aumento da sua síntese e liberação de GABA (LOSCHER, 2002). No entanto, vários outros mecanismos de ação têm sido propostos nos últimos anos. O AVP também é responsável por bloquear os canais de sódio dependentes de voltagem e canais de cálcio do tipo T (VAZQUEZ *et al.*, 2014).

Atualmente, existe uma série de substâncias com propriedade anticonvulsivante que podem ser utilizadas na clínica, entretanto, cerca de 30% dos pacientes não conseguem ter um tratamento adequado com esses fármacos. A resistência ao fármaco e um número considerável de reações adversas dificultam o tratamento, deixando uma parcela considerável de doentes sem um tratamento adequado (PUTTACHARY *et al.*, 2014).

Recentemente, foram desenvolvidas diversas novas DAEs, possibilitando outras opções para o tratamento de pacientes com epilepsias. A descoberta de novas drogas é necessária, pois muitos pacientes ainda apresentam resistência às DAEs estabelecidas. Além disso, é necessário a descoberta de novos fármacos antiepilépticos que não apresentem interação farmacocinética, drogas com diferentes mecanismos de ação que permitam uma terapia de combinação sinérgica e drogas com menor efeito colateral em comparação com a DAEs padronizadas. Portanto, tornou-se muito importante para entender a eficácia no tratamento da epilepsia, compreender os mecanismos de ação e a ocorrência de eventos adversos de novas drogas e interação medicamentosa da associação de fármacos, que desempenham um papel importante em terapia eficaz de combinação (LEE, 2014).

Foi verificado através de estudos como o de Martinc, Grabnar e Vovkç (2012) que a utilização das DAEs a longo prazo leva ao comprometimento do sistema de defesa antioxidante endógeno. Eles observaram que DAEs aumentam a peroxidação lipídica e diminuem a glutathione redutase e peroxidase. Foi demonstrado também que a carbamazepina, fenobarbital e o ácido valpróico (AVP) diminuem a atividade da superóxido dismutase (SOD), causando estresse oxidativo.

As DAEs atualmente existentes não são capazes de controlar as convulsões de uma parcela dos pacientes e, além disso, durante a terapia podem provocar efeitos adversos e

contribuir para o estresse oxidativo. No entanto, a associação de DAEs com uma terapia auxiliar, que apresente diferentes mecanismos de ação tais como agentes antioxidantes com ação neuroprotetora seria benéfica (PUTTACHARY *et al.*, 2014).

1.3 Vantagens da terapia combinada

Apesar DAEs disponíveis e da introdução de novas drogas nas últimas duas décadas, cerca de 30% dos pacientes com epilepsia ainda permanecem sem controle adequado das crises. Além disso, todas as DAEs apresentam efeitos colaterais que muitas vezes dificultam a adesão do paciente ou impossibilitam seu uso. Por conseguinte, existe uma necessidade significativa do desenvolvimento de novas DAEs que sejam mais eficazes e possuam menos efeitos colaterais (SHEKH-AHMAD; YAVIN, 2012).

Sabe-se que a terapia combinada pode ser uma interessante alternativa para melhoria da eficácia terapêutica, já que: (1) possibilita o uso de pelo menos dois compostos que podem atuar sobre diferentes elementos celulares e vias metabólicas; (2) permite reduzir as concentrações das drogas e o número de doses, contribuindo assim para a diminuição dos efeitos colaterais; (3) pode minimizar o risco de resistência às drogas (VIVAS *et al.*, 2008).

Os antioxidantes utilizados na terapia de combinação com antineoplásicos para pacientes com câncer, promovem a potencialização do mecanismo de ação das drogas, resultando na produção de menores efeitos colaterais, melhoria da qualidade de vida dos pacientes oncológicos e maior tempo de sobrevida (SANTOS, CRUZ, 2001). Visto isso, esperamos que a terapia de combinação de um antioxidante natural com drogas antiepilépticas também proporcione aos pacientes uma diminuição dos efeitos colaterais ocasionado pelo uso dos antiepilépticos, possibilitando um tratamento terapêutico mais eficaz.

1.4 Modelos animais de epilepsia

A fisiopatologia da epilepsia não está completamente definida. Os modelos de convulsão em animais reproduzem as alterações comportamentais e eletroencefalográficas que são semelhantes à epilepsia em humanos. Estes modelos podem também ser utilizados para estudar o desenvolvimento dos sistemas de neurotransmissores como moduladores da epileptogênese, como também permite observar as alterações comportamentais,

histopatológicas, e outros parâmetros neuroquímicos relacionados com a atividade epiléptica (FREITAS, 2008).

Diferentes tipos de modelos animais de epilepsia podem ser produzidos a partir da aplicação sistêmica de substâncias químicas como o ácido caínico e pilocarpina (GUEDES, 2006). Ambos os modelos replicam características presentes na epilepsia do lobo temporal em humanos (KANDRATAVICIUS *et al.*, 2010).

A epilepsia do lobo temporal humano é uma desordem crônica, frequentemente associada a um estímulo inicial precipitante como estado epiléptico, trauma e convulsões febris prolongadas (ENGEL; PEDLEY, 1997). Além disso, esse tipo de epilepsia é um dos distúrbios neurológicos mais comuns, apresentando taxa de prevalência de tempo de vida de 5% (DE LORENZO *et al.*, 2001). Uma preocupação existente é que aproximadamente um terço dos pacientes que apresentam a epilepsia do lobo temporal, apresentam resistência ao tratamento medicamentoso atualmente disponível (WALDBAUM; PATEL, 2010).

A pilocarpina, um agonista colinérgico muscarínico, quando administrado por via sistêmica em altas doses em roedores (~360 mg/kg), estimula um quadro de alterações comportamentais com manifestação de crises motoras límbicas que surgem aos 15-30 minutos após injeção, e podem persistir por horas (*status epilepticus*), caracterizando o período agudo do modelo (CAVALHEIRO, 1995; TURSKI *et al.*, 1983). O animal que sobrevive ao quadro agudo passa por um período latente, livre de crises comportamentais que tem duração média de 14 dias, que termina no momento em que o animal manifesta a primeira crise espontânea que persiste por toda a vida (LEITE *et al.*, 1990).

Na epilepsia, o hipocampo, o corpo estriado e o córtex fronto-parietal são as áreas em que ocorre dano neuronal, além de serem as áreas mais atacadas, podem estar relacionadas de forma importante com os mecanismos de instalação da propagação e/ou manutenção (epileptogênese) das convulsões límbicas (MARINHO *et al.*, 1998). Em geral, as convulsões induzidas por pilocarpina parecem depender da ativação do receptor muscarínico, da alteração da atividade enzimática de alguns sistemas, entre eles os sistemas de defesa antioxidante, do metabolismo dos fosfoinosítídeos (MARINHO *et al.*, 1998), como também da participação de outros sistemas de neurotransmissão noradrenérgico, dopaminérgico, serotonérgico, GABAérgico e glutamatérgico (CAVALHEIRO *et al.*, 1994; CAVALHEIRO *et al.*, 1995).

Estudos realizados sugerem o hipocampo como sítio de origem da atividade convulsiva induzida por pilocarpina (TURSKI *et al.*, 1983 a, b). Outros achados sugerem

como sítio inicial dessas convulsões o pálido ventral ou núcleo accumbens (CLIFFORD *et al.*, 1987). Estudos eletroencefalográficos e autoradiográficos, realizados posteriormente, sugeriram ambas as áreas como locais de início das convulsões (LABANDEIRA-GARCIA *et al.*, 1994; KULKARNI; GEORGE, 1995).

Segundo Silva e Cavalheiro (2004) os modelos experimentais permitiram ao longo da história um grande progresso no conhecimento dos mecanismos básicos das epilepsias e muitas DAEs foram criadas a partir de tais modelos. Atualmente, qualquer nova droga deve ser obrigatoriamente testada em modelos animais antes de sua utilização em seres humanos.

1.5 Epilepsia e o estresse oxidativo

O estresse oxidativo é ocasionado por um desequilíbrio entre as defesas antioxidantes e os radicais livres, que são gerados pela excitação excessiva dos neurônios (LIU *et al.*, 2012). Entre os radicais livres mais importantes destacam-se as espécies reativas de oxigênio (EROs) e as espécies reativas de nitrogênio (ERNs) (ILHAN *et al.*, 2005). As EROs são o radical ânion superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH), e as principais ERNs são o óxido nítrico (NO) e o peroxinitrito ($ONOO^-$) (APRIOKU, 2013).

Diversas doenças neurodegenerativas estão envolvidas com estresse oxidativo. O seu papel nas doenças neurodegenerativas é muito importante, porque as células do Sistema Nervoso Central (SNC) como os neurônios são extremamente sensíveis aos efeitos destrutivos das espécies reativas. Os efeitos nocivos das espécies reativas geralmente são neutralizados através do sistema de defesa endógeno de enzimas antioxidantes (glutathione redutase, glutathione peroxidase, superóxido dismutase e catalase) e antioxidantes não enzimáticos (glutathione, vitamina E, vitamina A, vitamina C e β -caroteno (MARTINC; GRABNAR; VOVK, 2014).

A epilepsia consiste numa doença neurodegenerativa, e sabe-se que o estresse oxidativo está envolvido (MEHVARI *et al.*, 2016). Vários estudos experimentais relacionam a epilepsia ao estresse oxidativo, apesar de não termos conhecimento ainda se o estresse oxidativo é uma causa ou consequência desta patologia, tem sido amplamente mencionado que o aumento da geração de radicais livres pode levar convulsões prolongadas podendo resultar em disfunção mitocondrial no hipocampo precedendo morte de células neuronal e causando subsequente epileptogênese (ARMENTA *et al.*, 2014).

Sabemos que a formação de EROs ocorre quando elétrons desemparelhados fogem da cadeia transportadora de elétrons e reagem com o oxigênio molecular, gerando assim superóxido, peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil (OH^\cdot), podendo assim interagir com o ácido desoxirribonucleico (DNA), proteínas e lipídeos e produzir um papel importante em muitas condições fisiológicas e fisiopatológicas. Para a função normal celular os níveis de EROs devem permanecer baixos e, portanto, os aumentos prolongados de EROs assumem um risco inerente de aumento na neurodegeneração, tais como o observado na epilepsia (ARMENTA *et al.*, 2014; SHIN *et al.*, 2011).

O peroxinitrito (ONOOH) que consiste em uma ERNs é um oxidante potente que pode nitrar resíduos de tirosina de proteínas estruturais e sob condições fisiológicas, pode reagir com outros componentes presentes em concentrações elevadas, tais como H_2O_2 ou CO_2 , e agir com função da NADPH-oxidase. O ONOOH é altamente reativo, induz a nitração da tirosina, peroxidação lipídica, e citotoxicidade, incluindo a morte celular (ARMENTA *et al.*, 2014).

Os radicais livres resultantes do desequilíbrio redox endógeno podem desempenhar um papel importante na determinação do estresse oxidativo, morte celular e consequentemente dano tecidual. O oxigênio reativo ocasiona a oxidação dos lipídeos de membrana promovendo consequentemente um processo denominado de peroxidação lipídica. A função e estrutura das membranas celulares são perturbadas e destruídas pela peroxidação lipídica. Esse processo gera subprodutos como aldeídos reativos que podem alterar ainda mais a sua função e, subsequentemente, provocar danos celulares. O malonildialdeído (MDA) é um dos aldeídos reativos mais amplamente estudado como marcadores laboratoriais de peroxidação lipídica (MARTINC; GRABNAR; VOVK, 2014).

O estresse oxidativo é conhecido por estar presente na epilepsia como causa e/ou consequência do processo de epileptogênese. Quando as defesas antioxidantes não são capazes de neutralizar os agentes estressantes, são necessárias fontes exógenas para a diminuição dos radicais e consequentes diminuições do estresse oxidativo. Diante disso, os produtos naturais parecem ser fontes promissoras de substâncias com atividade antioxidante (TIWARI, 2001).

1.6 Antioxidantes

Os antioxidantes são definidos como substâncias que retardam a velocidade de oxidação (SIES, 1993). Eles são capazes de neutralizar os radicais livres gerados pelo

metabolismo celular ou por fontes exógenas, impedindo o ataque sobre os lipídeos, os aminoácidos das proteínas, a dupla ligação dos ácidos graxos poliinsaturados e as bases do DNA, evitando a formação de lesões e perda da integridade celular (BIANCHI; ANTUNES, 1999). Substâncias naturais com atividade redutora e neutralizadora de radicais livres são muito utilizadas como agentes antioxidantes exógenos.

Os antioxidantes naturais dos organismos com função enzimática são representados pelas enzimas catalase, superóxido dismutase, glutathione redutase e peroxidase, necessárias para a continuidade da vida, por estarem associadas ao processo de detoxificação de compostos oxidantes formados nos seres vivos (LIU *et al.*, 2012). Havendo ocorrências de uma produção exagerada de agentes oxidantes nas células, serão necessárias fontes exógenas para a neutralização. Diante disso, uma fonte potencialmente promissora para obtenção exógena de produtos antioxidantes são os produtos naturais, uma vez que muitos alimentos e organismos vegetais são ricos em agentes antioxidantes (TIWARI, 2001).

Os alimentos, principalmente as frutas, verduras e legumes contêm agentes antioxidantes, tais como as vitaminas C, E e A, a clorofila, os flavonóides, carotenóides, curcumina e outros que são capazes de restringir a propagação das reações em cadeia e as lesões induzidas pelos radicais livres (BIANCHI; ANTUNES, 1999). Atualmente os pesquisadores vêm descobrindo diversas atividades nos organismos marinhos. Entre os organismos marinhos, macroalgas marinhas (mais conhecidas como algas) são alguns dos recursos mais biologicamente ativos da natureza, por possuir uma riqueza de compostos bioativos (SILVA *et al.*, 2012).

Já existem na literatura diversos estudos da ação antioxidante de algas, mas apesar de o Brasil apresentar uma riqueza em relação a flora ficológica, esse campo de pesquisa não foi devidamente explorado (MENESES, 2010; ROCHA *et al.*, 2007). Nesse contexto, existe uma necessidade de serem realizados mais estudos com nossa biodiversidade ficológica marinha, para dispormos de um maior número de substâncias naturais extraídas a partir das algas, já que temos uma diversidade dessas espécies, que ainda foi pouco explorada.

Estudos realizados por Fujimoto e Kaneda (1980), mostraram que dentre os tipos de algas existentes, as algas pardas, em geral, apresentaram uma maior atividade antioxidante, particularmente, *Eisenia bicyclis*, *Sargassum kjellmanianum*, *Ishige okamurae*, *Undaria pinnatifida*, *Heterochordaria abientina* e *Scytosiphon lomentaria*.

Quimicamente os metabólitos bioativos que podem ser extraídos das algas incluem fenóis bromados, heterocíclicos oxigenados, nitrogenados e enxofre, terpenóides, peptídeos, proteínas e os polissacarídeos (BHACUNI, RAWAT, 2005). Os polissacarídeos extraídos de algas marinhas possuem várias atividades biológicas com potenciais benefícios para a saúde, e diversas aplicações na área farmacêutica, alimentícia, biomédica e biotecnológica.

1.7 Polissacarídeos extraídos de algas pardas

As algas comumente pertencem a quatro grupos diferentes determinados com base na cor, sendo elas: algas azuis, algas vermelhas, algas verdes e algas pardas. Esses organismos apresentam um alto valor nutritivo, sendo ricas em carotenoides, proteínas, fibras dietéticas, ácidos graxos essenciais, vitaminas e minerais (VASCONCELOS *et al.*, 2015).

As algas marrons ou algas pardas (filo Ochrophyta, classes: Phaeophyceae), com cerca de 1.750 espécies, são organismos pluricelulares predominantemente marinhos (típicos em mares frios), vivendo fixados em um substrato ou flutuando, formando imensas florestas submersas (KILINÇ *et al.*, 2013). É válido ressaltar que esses organismos consistem em um alimento que é consumido por todo o mundo, principalmente na China onde faz parte da culinária e é descrito em medicamentos tradicionais chineses há mais de 1000 anos (CUI *et al.*, 2012).

A alga parda *Fucus vesiculosus* é um membro da família Fucaceae, que pertence à ordem Fucales. Ela cresce nas costas temperadas rochosas no meio litoral e entre marés da Europa e da América do Norte (PARYS *et al.*, 2010). A partir dessas algas podem ser extraídos polissacarídeos que são polímeros de carboidratos formados de um único tipo de monossacarídeo ou de diferentes tipos. Essas macromoléculas são solúveis em água, onde desempenham importante papel como espessante, gelificante, emulsificante e hidratante (RINAUDO, 2008). Esses compostos vêm se destacando por possuir diversas atividades biológicas e pela abundância nos organismos marinhos. Os principais polissacarídeos conhecidos de algas marinhas são carragenanas, agaranas e alginatos, mas também são relatadas as galactanas híbridas, fucanase laminarinas (VASCONCELOS *et al.*, 2015).

Das algas pardas, podem ser extraídos os polissacarídeos fucanas (homofucanas) e fucoïdanas (heterofucanas), presentes em sua parede extracelular, onde seu principal componente é a L-fucose um monossacarídeo sulfatado (ROCHA *et al.*, 2004). A presença de

atividades biológicas mostradas pelo polissacarídeo fucoidana, extraído a partir da alga parda *F. vesiculosus* é provavelmente devido a presença do grupo sulfatado em quantidades variadas. Além disso, a disposição dos grupos sulfatados ao longo da espinha dorsal da alga parda, também desempenha um papel importante nas suas propriedades ativas (WIJESINGHE; JEON, 2012).

1.7.1 Atividades antioxidante e anti-inflamatória de Fucoïdana

Os processos inflamatórios podem ser desencadeados por estímulos externos ou internos. A inflamação está relacionada com várias doenças no SNC, incluindo as doenças autoimunes, neurodegenerativas e desordens convulsivas. Citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias são encontradas no SNC e no plasma em modelos experimentais e em estudos clínicos de epilepsia. Estudos experimentais em roedores têm demonstrado que as reações inflamatórias no cérebro após episódios convulsivos podem aumentar a excitabilidade neuronal, contribuir para o dano celular, e alterar a permeabilidade da barreira hematoencefálica (VEZZANI; GRANATA, 2005).

A Fucoïdana compreende um grupo de polissacarídeos sulfatados ricos em fucose contendo diferentes quantidades de galactose, xilose, ácido glucurônico. Foi demonstrado através de estudos que a fucoïdana possui diversas atividades biológicas, incluindo antitumoral, imunomoduladora, antiviral, antitrombótica, anticoagulante, antioxidante e anti-inflamatória (HUANG *et al.*, 2016). Kang e colaboradores (2011) investigaram a atividade anti-inflamatória da fucoïdana em células RAW 264.7, em modelo de inflamação induzida por lipopolissacarídeo (LPS) e seus resultados demonstraram que o polissacarídeo sulfatado foi capaz de reduzir a expressão do gene da ciclo-oxigenase-2 (COX-2), diminuir a produção de NO e de prostaglandina-E2 (PGE2) de maneira dose-dependente.

As fucanas vêm sendo descritas como possuidoras das mais diversas atividades farmacológicas. Cui e colaboradores (2012) realizaram um estudo da atividade neuroprotetora e antioxidante do polissacarídeo fucoïdana em ratos em um modelo de doença de Parkinson induzido por LPS. Os resultados obtidos demonstraram o potencial anti-inflamatório desse polissacarídeo, mostrando que este foi capaz de diminuir a ativação das micróglias, os níveis de TNF- α , a geração de EROs e com isso recuperar a concentração de neurônios tirosina-hidrosilase (TH) positivos. Foi verificado um efeito neuroprotetor, anti-inflamatório e

antioxidante, sugerindo que este composto apresentaria um potencial terapêutico em doenças que ocasionam degeneração dos neurônios.

No estudo realizado por Do e colaboradores (2010) foi demonstrado que o polissacarídeo fucoidana pode ser um agente terapêutico potencial para o tratamento de lesão inflamatória relacionada com doenças neurológicas. Nesse estudo verificaram que a fucoidana foi capaz de inibir a produção de NO e óxido nítrico sintase induzida (iNOS) em cultura de células do glioma do rato (C6) estimuladas por fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e interferon gama (IFN- γ). Sabendo, pois que, o aumento da produção de NO e iNOS está relacionada com diversas doenças neurodegenerativas, a fucoidana possivelmente poderia ser utilizada no tratamento dessa doença, já que, foi capaz de reduzir a concentração desses compostos.

Em levantamento de literatura realizado por Wijesinghe e Jeon (2012) foi demonstrado que os produtos extraídos a partir de algas pardas podem ser potenciais agentes terapêuticos no tratamento de doenças. No entanto, suas propriedades bioativas devem ser ainda estudadas para que representem um avanço interessante na pesquisa científica e venha a se tornar um produto de mercado aliado à saúde humana.

A Epilepsia consiste em um dos principais transtornos neurológicos, com prevalência de 1% na população mundial (ROWLEY *et al.*, 2015). Dados da literatura demonstram que cerca de 30% dos pacientes não respondem ao tratamento medicamentoso disponível, e quando utilizados em longo prazo causam efeitos colaterais (WAHAB, 2010), visto isso, a combinação de drogas antiepilépticas com um composto natural seria de grande relevância para o tratamento de pacientes com epilepsia. A fucoidana um polissacarídeo sulfatado, que segundo estudos realizados em outros modelos animais, vem apresentando atividade neuroprotetra, poderá apresentar-se nesse modelo como uma forte candidata na terapia de combinação de drogas, já que a combinação de agentes antioxidantes pode diminuir os efeitos tóxicos ocasionados pelo uso a longo prazo dos antiepiléptico, através da neutralização dos radicais livres e consequente diminuição do estresse oxidativo.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

- Avaliar o efeito do polissacarídeo fucoídano, sozinho ou em associação com o ácido valpróico no modelo de convulsão induzida por pilocarpina em camundongos.

2.2 Específicos

- Analisar o efeito do tratamento com fucoídano sozinha e/ou em associação com o ácido valpróico sobre as alterações comportamentais de camundongos em modelo de convulsão induzida por pilocarpina.
- Determinar o efeito do tratamento com fucoídano sozinha e/ou em associação com o ácido valpróico sobre a peroxidação lipídica, no córtex pré-frontal, corpo estriado e hipocampo de camundongos em modelo de convulsão induzida por pilocarpina.
- Avaliar o efeito do tratamento da fucoídano sozinha e/ou em associação com o ácido valpróico sobre o estresse oxidativo através da determinação das concentrações de nitrito/nitrato no córtex pré-frontal, corpo estriado e hipocampo de camundongos em modelo de convulsão induzida por pilocarpina.
- Investigar o efeito do tratamento com fucoídano sozinha e/ou em associação com o ácido valpróico sobre os sistemas antioxidantes endógenos através da determinação dos níveis de glutatona reduzida (GSH) no córtex pré-frontal, corpo estriado e hipocampo de camundongos em modelo de convulsão induzida por pilocarpina.

3 METODOLOGIA

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos *Swiss*, machos, pesando entre 25-30 g provenientes do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC. Os animais foram mantidos em suas casas gaiolas, com no máximo 8 animais, à temperatura média de $24 \pm 2^\circ\text{C}$ em ciclos de alternância claro/escuro de 12 horas, recebendo ração padrão para roedores e água *ad libitum*.

3.2 Aspectos éticos

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da UFC com o número 4/15 e todos os procedimentos experimentais foram realizados em estrita conformidade com as normas internacionais de uso de animais em experimentação.

3.3 Drogas utilizadas

Quadro 1 — Drogas utilizadas nos experimentos

Cloridrato de pilocarpina (Sigma Chemical Co., USA).
Fucoidan de <i>Fucus vesiculosus</i> (Sigma Chemical., Co., USA)
Ácido valpróico (valproato de sódio), comprimidos 500 mg (biolab)

3.4 Protocolo de tratamento dos grupos experimentais

Os experimentos foram realizados entre 8:00 e 10:00 horas. Os animais receberam injeção de fucoidana (7,5, 15 e 30 mg/kg, i.p.), baseado nos procedimentos propostos por Cui e colaboradores (2012), ácido valpróico (100 e 400 mg/kg, i.p.) e solução salina- NaCl 0,9% i.p. (a pilocarpina e as demais drogas foram dissolvidas em solução salina) durante 14 dias. Após esse período, no último dia passados 30 minutos do tratamento, os animais foram tratados com pilocarpina 400 mg/kg, i.p., (**P400**) e observados por 1 hora as alterações comportamentais. Outro grupo recebeu apenas solução salina, i.p (**Quadro 2**).

Quadro 2 — Protocolo de Tratamento Experimental

GRUPOS	TRATAMENTO
1	Solução salina - NaCl 0,9% + P400
2	Solução salina - NaCl 0,9%
3	Fuoidana (7,5 mg/kg, i.p.) + P400
4	Fuoidana (15 mg/kg, i.p.) + P400
5	Fuoidana (30 mg/kg, i.p.) + P400
6	Ácido valpróico (100 mg/Kg, i.p.) + P400
7	Ácido valpróico (400 mg/Kg, i.p.) + P400
8	Ácido valpróico (100 mg/Kg, i.p.) + fuoidana (7,5 mg/kg, i.p.) + P400

Após a injeção de pilocarpina, os animais tratados e controles foram colocados em ambiente reservado para observação dos grupos pelo período de 1h. Os animais que não receberam pilocarpina foram observados por igual período. Os animais que não sobreviveram até o final do período de observação foram decapitados. Os sobreviventes foram sacrificados por deslocamento cervical e decapitados depois do estudo comportamental. As áreas cerebrais foram imediatamente isoladas, removidas sobre gelo e armazenadas à -80°C para a realização dos estudos neuroquímicos.

3.5 Estudo Comportamental

3.5.1 Alterações comportamentais após indução de convulsões e estado epilético por administração de pilocarpina

Os animais tratados e controles foram divididos em gaiolas contendo 5 a 8 animais e colocados em ambiente reservado, sendo feita a observação direta. Todos os grupos experimentais foram observados durante 1 hora após a última injeção da droga, de acordo com o tratamento previsto. Os seguintes parâmetros foram observados: presença de sinais colinérgicos periféricos, convulsões motoras, instalação de estado epilético, número de mortes, latência de convulsão e latência de morte em cada grupo. A Tabela 1 apresenta estes parâmetros juntamente com suas características. Depois desse período de observação, os animais foram utilizados para estudos neuroquímicos.

Tabela 1 — Parâmetros Comportamentais Observados

PARÂMETROS	CARACTERÍSTICAS
1. Sinais colinérgicos periféricos (SCP)	Tremores, miose, cromodacriorréia, piloereção, diarreia, salivação
2. Convulsão	Tônico/clônica
3. Estado epiléptico	Convulsões intermitentes
4. Nº de mortes	Determinado durante o período de 1 hora depois da última administração realizada
5. Latência de convulsão	Intervalo de tempo em minutos entre a última injeção e o aparecimento da primeira convulsão
6. Latência de morte	Intervalo de tempo em minutos entre a última injeção e a morte do animal

Fonte: Adaptado de Turski *et al.*, 1983a.

3.6 Dissecação das áreas cerebrais

Após a realização do teste de convulsão induzida por pilocarpina, os animais que não sobreviveram até o final do período de observação foram decapitados. Os sobreviventes foram sacrificados por deslocamento cervical e decapitados após estudo comportamental. O cérebro foi removido e as áreas cerebrais foram dissecadas. Todo o procedimento foi realizado na presença de gelo, sendo removido o córtex pré-frontal (CPF), o corpo estriado (CE) e hipocampo (HC), com uma tesoura de microdissecação. Terminada a dissecação, cada área foi colocada em papel alumínio, sobre gelo, pesada e armazenada a -80 °C para uso posterior.

3.7 Determinação do estresse oxidativo

3.7.1 Determinação da peroxidação lipídica

O grau de lipoperoxidação nas áreas cerebrais (córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado) foi medido através da determinação das concentrações de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme o método de Draper e Hadley (1990), seguindo o protocolo a seguir. Os tecidos cerebrais foram homogeneizados a 10% em tampão fosfato 50

mM (pH 7,4) gelado. Sessenta e três microlitros (63 μ L) do homogenato foram removidos. Posteriormente, 100 μ L de ácido perclórico (35%) foram adicionados, para interromper a peroxidação, e centrifugados a 14000 rotações por minuto (rpm) 4°C por dez minutos. Em seguida, 150 μ L do sobrenadante foram retirados, e adicionados a 50 μ L de ácido tiobarbitúrico 1,2%. A mistura foi levada ao banho maria, por 30 (trinta) minutos, a uma temperatura variável de 95 – 100°C. A solução foi então retirada e colocada para esfriar a temperatura ambiente. Após isso, foi feita a leitura em ELISA (Enzyme Linked Immunono Sorbent Assay) a 532 nm. Os resultados foram expressos em micromol de MDA por mg de proteína.

- Curva-padrão de MDA

A partir da solução padrão de MDA, foram preparadas as soluções a 0,627; 1,247; 2,463; 4,8; 9,16 e 16,77 μ mol. O branco foi feito com água destilada. A leitura da absorbância foi feita a 535 nm para determinação da equação da curva-padrão de MDA.

3.7.2 Determinação da concentração de nitrito/nitrato

Para a determinação da produção de nitrito, primeiramente foi preparado uma curva padrão. Para isso, foram pesados 6,9 mg de NaNO₂ e dissolvidos em 10 mL de água bidestilada (estoque-10 mM) e feitas as diluições em série (10 e 20 x), ficando 1 mM, 100 μ M, 10 μ M, 5 μ M, 2,5 μ M, 1,25 μ M, 0,625 μ M, 0,312 μ M. Foi realizada uma equação da reta para o cálculo das concentrações do teste (GREEN *et al.*,1982). Para a determinação da concentração de nitrito de acordo com o método de Green *et al.*, (1982) em cada tecido, foram preparados homogenatos das áreas cerebrais a 10% (p/v) em tampão fosfato 50 mM (pH 7,4). Após a centrifugação (11000 g, 15 min) os sobrenadantes foram coletados e a produção de óxido nítrico (NO) determinada através da reação de Griess. Uma alíquota de 100 μ L do sobrenadante foi incubada com 100 μ L do reagente de Griess [sulfanilamida 1% em H₃PO₄ 1%/N-(-1-naphthyl)-ethylenediamine 0,1%/ H₃PO₄ 1% / diluído em água (1:1:1:1)] a temperatura ambiente por 10 minutos. A absorbância foi medida em espectrofotômetro a 540 nm. A concentração de nitrito/nitrato (μ M) foi determinada a partir de uma curva padrão de NaNO₂.

3.7.3 Determinação da Concentração da Glutathiona Reduzida (GSH)

Na Epilepsia uma diminuição dos níveis de glutathiona está relacionada com o aumento de EROs, justificado pela atividade da glutathiona de fornecer uma neuroproteção contra a excitotoxicidade (ROSA, 2005). Sabendo disso, para avaliar a atividade antioxidante foi determinada a concentração de GSH, que se baseia na reação do reagente de Ellman (5,5'-ditiobis-ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB) com o tiol livre originando um dissulfeto misto mais ácido 2-nitro-5-tiobenzóico. Inicialmente preparou-se o homogenato a 10% em EDTA 0,02 M, em seguida foi retirado 400 μ L desse homogenato e adicionado 320 μ L de água destilada e mais 80 μ L de ácido tricloracético a 50%. O material foi agitado e centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos. Em seguida, foi recolhido 400 μ L do sobrenadante e acrescentado 800 μ L de tampão Tris-HCL 0,4 M, pH 8,9 e mais 20 μ L de DTNB 0,01M e após 1 minuto da reação foi feita a leitura da coloração em 412 nm através de um espectrofotômetro. A concentração de glutathiona reduzida foi expressa em nanogramas de GSH/g de tecido, tendo por base uma curva padrão. A curva padrão foi construída a partir da solução padrão de GSH (1mg/mL), a qual foi preparada em triplicata de soluções a 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 μ g/mL. O branco foi feito com água destilada (4 mL) e a cada tubo das soluções de GSH foi acrescentado de 4 mL de tampão Tris HCl 0,4M (pH 8,9). Para a determinação da equação da curva padrão de GSH, foi adicionado ainda a cada tubo 0,1 mL de DTNB (SELDLAK *et al.*, 1988).

4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos através da média \pm EPM. Para as diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foi analisado por análise de variância (ANOVA) seguido de pós-teste Bonferroni. Quando $P < 0,05$, as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas. Os asteriscos (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) caracterizam o grau de significância.

5 RESULTADOS

5.1 Estudo comportamental

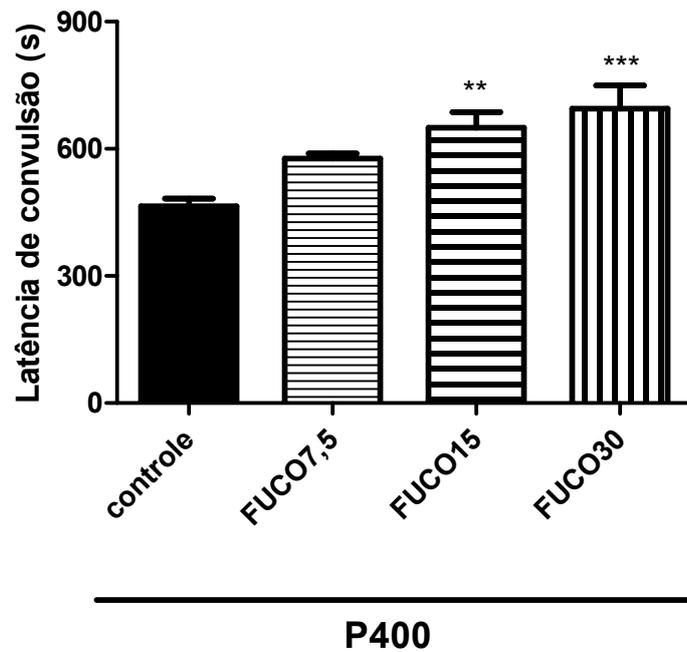
5.1.1 Teste da Convulsão Induzida por Pilocarpina em camundongos tratados ou não com Fucoïdana (FUCO) nas doses de 7,5, 15 e 30 mg/Kg.

Após a administração de pilocarpina, 400mg/Kg, i.p. (P400) os animais demonstraram sinais colinérgicos periféricos (100%) (miose, piloereção, cromodacriorréia, salivação, diarreia, diurese e tremores) movimentos estereotipados (aumento da atividade de roer, coçar, mastigar e *wet-dog shakes* – ato de sacudir semelhante a um cachorro molhado), progredindo para convulsão motora límbica.

Foram avaliadas as latências de convulsão e de morte em segundos. Os animais tratados com fucoïdana nas doses de 7,5, 15 e 30 mg/Kg apresentaram aumento da latência de convulsão (s) [FUCO7,5: $576,8 \pm 12,12$; FUCO15: $649,5 \pm 37,38$; FUCO30: $694,6 \pm 54,85$] quando comparado ao grupo da pilocarpina [P400: $464,4 \pm 18,37$]. Os melhores resultados foram observados nas doses de 15 e 30 mg/Kg, onde houve aumento da latência de convulsão em cerca de 40% (FIGURA 1).

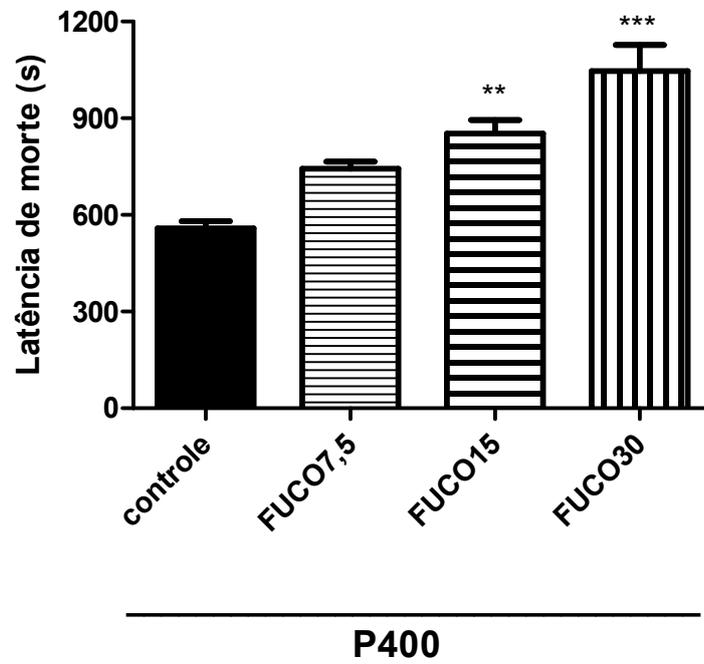
Por sua vez, houve um aumento também na latência de morte (s) nas doses de 7,5, 15 e 30 mg/Kg [FUCO7,5: $743,6 \pm 21,83$; FUCO15: $852,0 \pm 42,54$; FUCO30: $1046 \pm 80,91$] quando comparado ao grupo da pilocarpina [P400: $558,6 \pm 21,90$]. E novamente, os melhores resultados foram observados nas doses de 15 e 30 mg/Kg, com redução de 52,5% e 87,2%, respectivamente (FIGURA 2).

Figura 1 — Efeito da Fucoïdana nas doses de 7,5, 15 e 30 mg/Kg sobre a latência de convulsão no teste de Convulsão Induzida por Pilocarpina em camundongos.



Grupos tratados com Fucoïdana nas doses (7,5, 15 e 30 mg/Kg; i.p.) durante 14 dias e após 30 minutos do tratamento no 14^a dia foi induzida a convulsão com P400 (400 mg/Kg; i.p.). Os valores representam a média \pm EPM da latência de convulsão. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido de pos-teste de Bonferroni. Valores significativos comparados ao controle (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) vs controle.

Figura 2 — Efeito da Fucoïdãna nas doses de 7,5, 15 e 30 mg/Kg sobre a latência de morte no teste de Convulsão Induzida por Pilocarpina em camundongos.



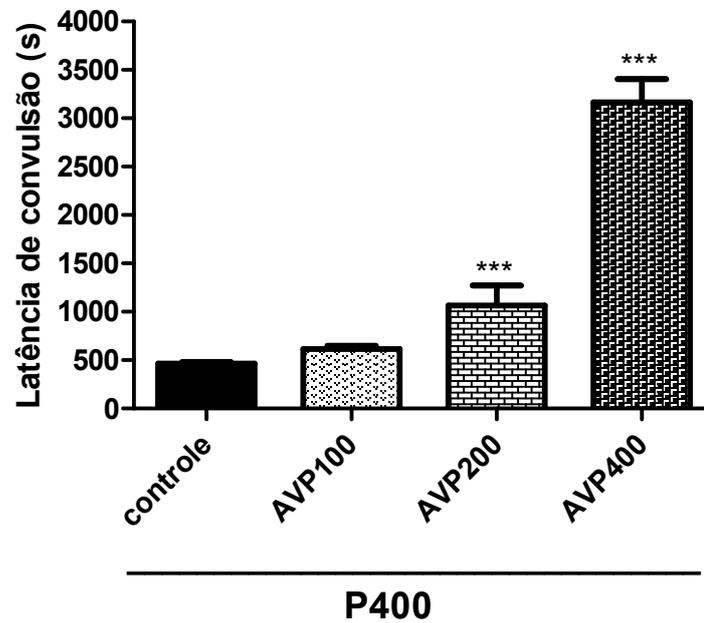
Grupos tratados com Fucoïdãna nas doses (7,5, 15 e 30 mg/Kg; i.p.) durante 14 dias e após 30 minutos do tratamento no 14^a dia foi induzida a convulsão com P400 (400 mg/Kg; i.p.). Os valores representam a média \pm EPM da latência de morte. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido de pos-teste de Bonferroni. Valores significativos comparados ao controle (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) vs controle.

5.1.2 Teste da Convulsão Induzida por Pilocarpina em camundongos tratados ou não com ácido valpróico (AVP) nas doses de 100, 200 e 400 mg/Kg.

A administração de AVP durante 14 dias aumentou a latência de convulsão (s) em duas doses testadas, no entanto, a dose de 400 mg/Kg foi a que mostrou melhor resultado [AVP100: $615,1 \pm 34,09$; AVP200: $1065 \pm 208,2$; AVP400: $3164 \pm 242,0$]. A dose de 100 mg/Kg foi utilizada neste trabalho como uma subdose, por não ter mostrado diferença significativa do controle P400 [P400: $464,4 \pm 18,37$]. Na dose de 400 mg/Kg de AVP não foi observada a manifestação de convulsão nos animais analisados (FIGURA 3).

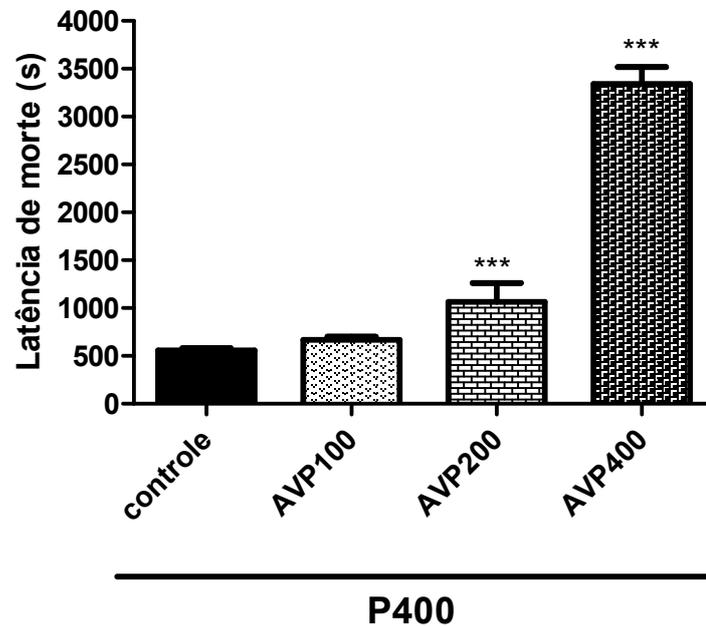
Em relação a latência de morte (s) foi verificado um aumento, mostrado pela administração do AVP em duas doses analisadas, na dose de 200 mg/Kg houve aumento em cerca de 90% e na dose de 400 mg/kg aumentou quase 5 vezes a latência de morte [AVP100: $666,9 \pm 33,65$; AVP200: $1066 \pm 196,7$; AVP400: $3343 \pm 176,0$] quando comparado com o grupo controle [P400: $558,6 \pm 21,90$]. No grupo da dose de 400 mg/Kg, 89% dos animais sobreviveram ao episódio convulsivo e foram sacrificados no final do experimento (FIGURA 4).

Figura 3 — Efeito do ácido valpróico nas doses de 100, 200 e 400 mg/Kg sobre a latência de convulsão no teste de Convulsão Induzida por Pilocarpina em camundongos.



Grupos tratados com Ácido Valpróico nas doses (100, 200 e 400 mg/Kg; i.p.) durante 14 dias e após 30 minutos do tratamento no 14^a dia foi induzida a convulsão com P400 (400 mg/Kg; i.p.). Os valores representam a média \pm EPM da latência de convulsão. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido de pos-teste de Bonferroni. Valores significativos comparados ao controle (*** $p < 0,001$) vs controle.

Figura 4 — Efeito do ácido valpróico nas doses de 100, 200 e 400 mg/Kg sobre a latência de morte no teste de Convulsão Induzida por Pilocarpina em camundongos.



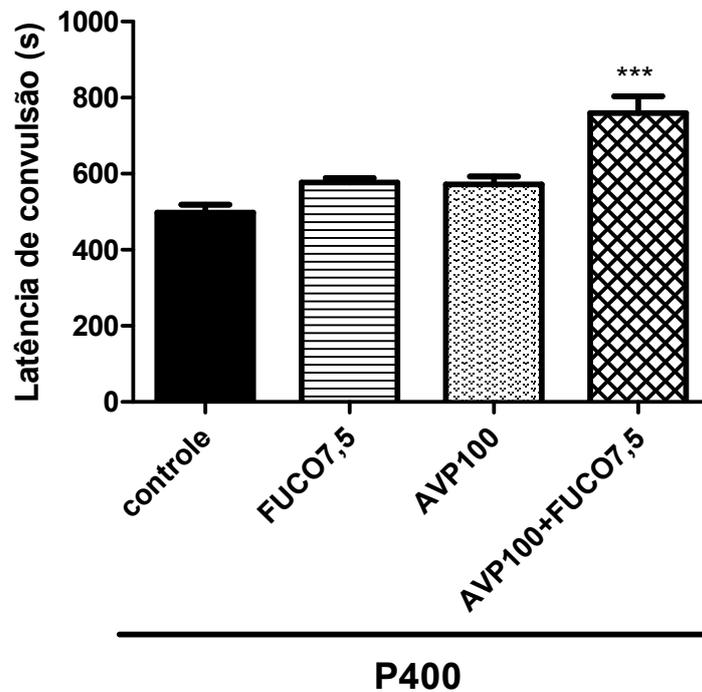
Grupos tratados com Ácido Valpróico nas doses (100, 200 e 400 mg/Kg; i.p.) durante 14 dias e após 30 minutos do tratamento no 14^a dia foi induzida a convulsão com P400 (400 mg/Kg; i.p.). Os valores representam a média \pm EPM da latência de morte. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido de pos-teste de Bonferroni. Valores significativos comparados ao controle (**p<0,01) vs controle.

5.1.3 Teste da Convulsão Induzida por Pilocarpina em camundongos tratados ou não com a associação de ácido valpróico 100 mg/Kg e Fucoïdana 7,5 mg/Kg (AVP100+FUCO7,5)

A administração da associação de AVP100+FUCO7,5, i.p., durante 14 dias aumentou a latência de convulsão (s) em cerca de 52% [AVP100+FUCO7,5: 759,3 ± 44,07] quando comparado com o grupo controle [P400: 497,8 ± 21,26]. Foi verificada uma melhora do efeito do ácido valpróico na dose de 100 mg/kg quando associado a fucoïdana (AVP100+FUCO7,5) (FIGURA 5).

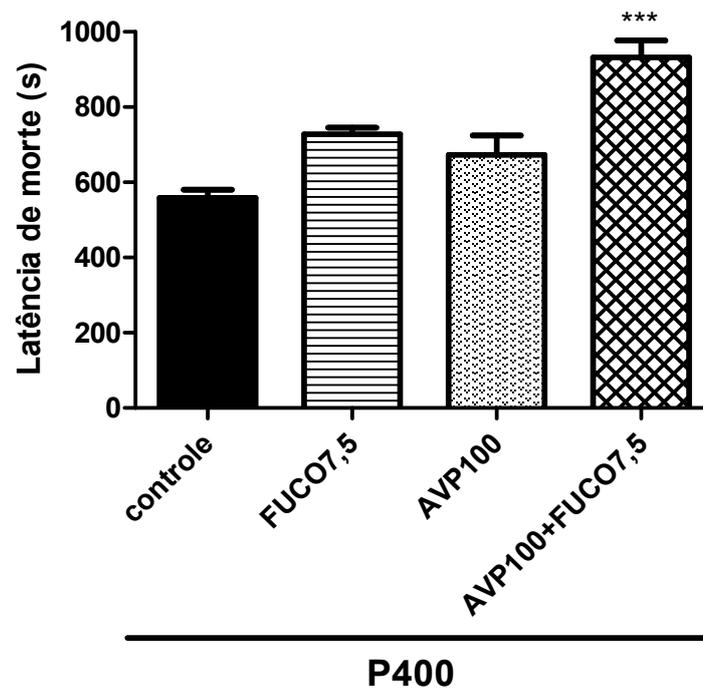
Foi verificado aumento na latência de morte (s) em cerca de 67% na associação de AVP100+FUCO7,5 [AVP100+FUCO7,5: 932,4 ± 44,31] quando comparado com o grupo controle [P400: 558,6 ± 21,90] (FIGURA 6). Novamente foi observada uma melhora do efeito do ácido valpróico quando associado a fucoïdana.

Figura 5 — Efeito da associação de ácido valpróico na dose de 100 mg/Kg e fucoidana na dose de 7,5 mg/Kg (AVP100+FUCO7,5, i.p.) sobre a latência de convulsão no teste de convulsão Induzida por Pilocarpina em camundongos.



Grupos tratados com a associação de AVP100+FUCO7,5, i.p., e após 30 min foi induzida a convulsão com P400 (400 mg/Kg; i.p.). Os valores representam a média \pm EPM da latência de convulsão. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido de pos-teste de Bonferroni. Valores significativos comparados ao controle (***) $p < 0,001$ vs controle.

Figura 6 — Efeito da associação de ácido valpróico na dose de 100 mg/Kg e fucoidana na dose de 7,5 mg/Kg (AVP100+FUCO7,5, i.p.) sobre a latência de morte no teste de Convulsão Induzida por Pilocarpina em camundongos.



Grupos tratados com a associação de AVP100+FUCO7,5, i.p., e após 30 min foi induzida a convulsão com P400 (400 mg/Kg; i.p.). Os valores representam a média \pm EPM da latência de morte. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido de pos-teste de Bonferroni. Valores significativos comparados ao controle (***) $p < 0,001$ vs controle.

5.2 Determinação da atividade antioxidante do tratamento com fucoidana e/ou ácido valpróico no modelo de convulsão induzida por pilocarpina.

5.2.1 Efeitos do tratamento com fucoidana sozinha e/ou em associação com ácido valpróico sobre a produção de substâncias ácidas reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em áreas cerebrais de camundongos submetidos ao modelo de convulsão induzido por pilocarpina.

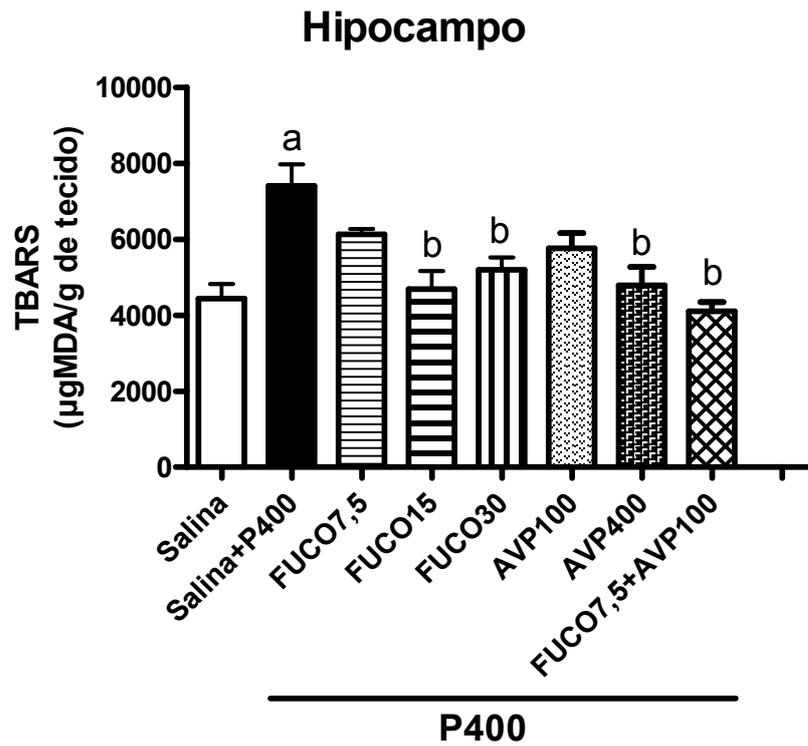
Os resultados da análise da produção de substância reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) em hipocampo, corpo estriado e córtex pré-frontal dos diferentes grupos de tratamento foram expressos em μg de MDA (malonildialdeído)/ mg de proteínas (FIGURAS 7, 8, 9 RESPECTIVAMENTE).

A indução da convulsão com pilocarpina (400 mg/kg) provocou um aumento em cerca de 67% na concentração de MDA no hipocampo dos animais quando comparado ao grupo tratado apenas com salina ($p < 0,01$). O tratamento com FUCO nas doses de 15 e 30 mg/Kg foi capaz de reduzir a elevação dos níveis de MDA induzida por P400 em cerca de 37% e 30%, respectivamente. Embora a FUCO na dose de 7,5 mg/kg e AVP na dose de 100 mg/kg sozinhos não tenham alterado a elevação dos níveis de MDA provocada pela P400, a sua associação provocou uma diminuição da concentração de MDA para níveis semelhantes aos do controle SALINA [Hipocampo: SALINA: $4441 \pm 383,3$; SALINA+P400: $7406 \pm 565,0$; FUCO 7,5+P400: $6129 \pm 142,3$; FUCO15+P400: $4684 \pm 480,0$; FUCO30+P400: $5195 \pm 327,6$; AVP 100+P400: $5758 \pm 401,0$; AVP400+P400: $4790 \pm 480,7$; AVP100+FUCO7,5+P400: $4107 \pm 237,7$] (FIGURA 7).

Foi observado aumento de cerca de 47% na concentração de MDA no córtex pré-frontal dos animais tratados com SALINA+P400 em relação ao grupo tratado apenas com SALINA ($p < 0,01$). O tratamento com FUCO nas três doses analisadas (7,5, 15 e 30 mg/kg) foi capaz de reduzir a elevação dos níveis de MDA induzida por P400. Mesmo que o AVP na dose de 100 mg/kg sozinho não tenha alterado a elevação dos níveis de MDA provocada pela P400, a sua associação impediu o aumento dos níveis de MDA provocado pela pilocarpina, deixando a concentração próxima ao valor observado no grupo SALINA [Córtex pré-frontal: SALINA: $4820 \pm 478,5$; SALINA+P400: $7066 \pm 328,2$; FUCO 7,5+P400: $5233 \pm 432,5$; FUCO15+P400: $5193 \pm 292,5$; FUCO30+P400: $5195 \pm 327,6$; AVP 100+P400: $5739 \pm 248,6$; AVP400+P400: $3052 \pm 211,4$; AVP100+FUCO7,5+P400: $4623 \pm 179,3$] (FIGURA 8).

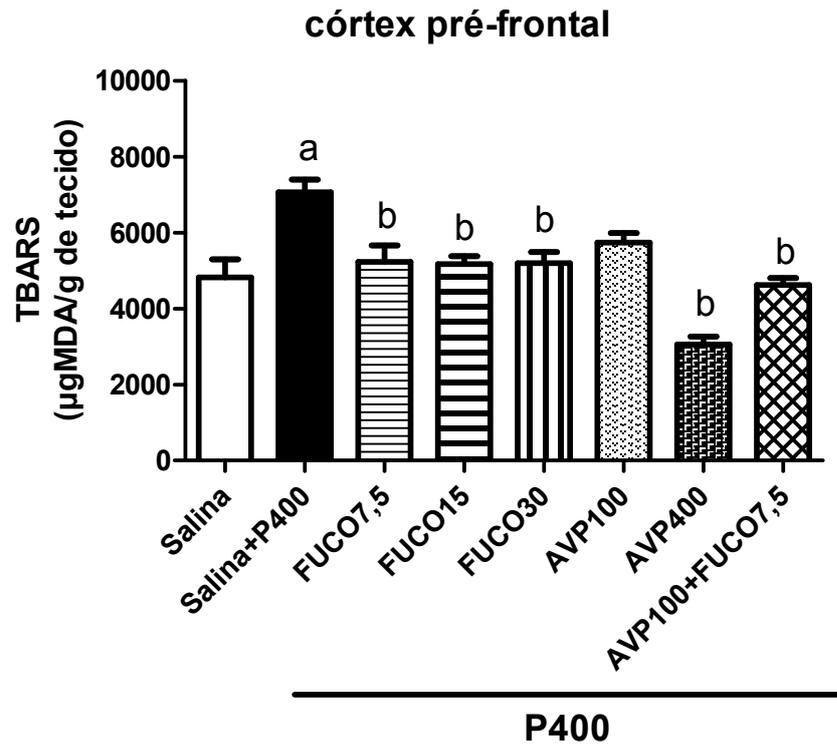
Assim como foi observado nas outras áreas testadas, a pilocarpina também provocou aumento na concentração de MDA no corpo estriado ($p < 0,01$). O tratamento com FUCO nas doses de 7,5 e 30 mg/Kg foi capaz de reduzir a elevação dos níveis de MDA induzida por P400. Observamos que FUCO e AVP sozinhos não apresentaram efeito significativo com relação aos níveis de MDA no corpo estriado dos animais, mas quando associados houve uma diminuição dos níveis de MDA para níveis próximos aos do controle SALINA [Corpo esriado: SALINA: $3826 \pm 268,8$; SALINA+P400: $6359 \pm 510,7$; FUCO7,5+P400: $4759 \pm 354,8$; FUCO15+P400: $5195 \pm 211,0$; FUCO30+P400: $4940 \pm 189,7$; AVP100+P400: $3977 \pm 152,4$; AVP400+P400: $3826 \pm 268,8$; AVP100+FUCO7,5+P400: $2748 \pm 204,8$] (FIGURA 9).

Figura 7 — Efeito do tratamento com FUCO sozinha e/ou em associação com AVP sobre a produção de substâncias ácidas reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) em hipocampo de camundongos tratados com P400.



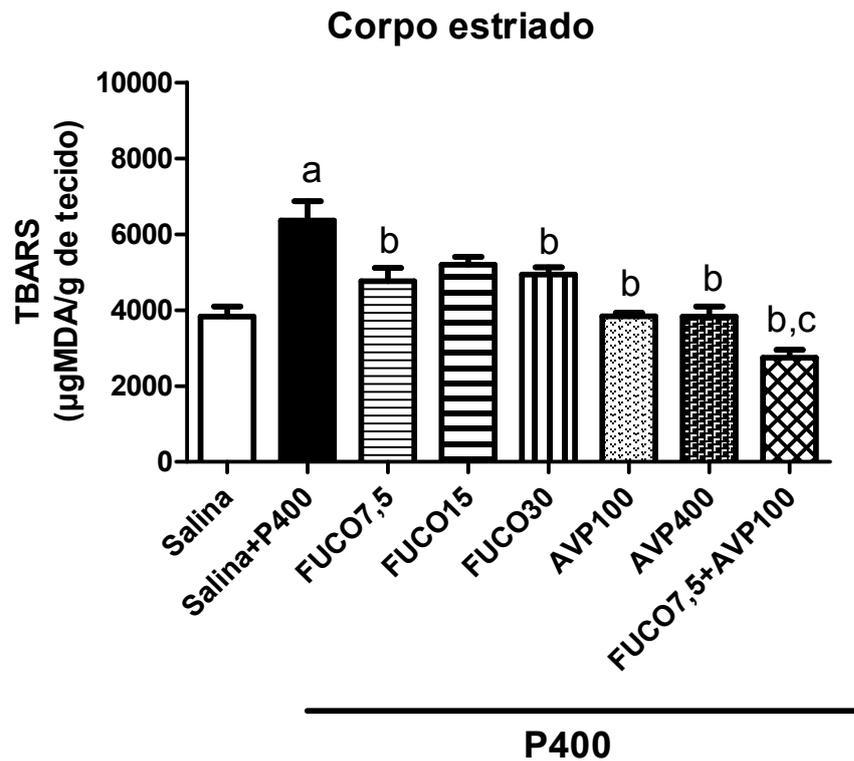
Determinação da ocorrência de lipoperoxidação, com base na concentração de MDA, em animais tratados com salina, salina + P400, FUCO (7,5, 15 e 30 mg/Kg i.p.) + P400, AVP (100 e 400 mg/Kg i.p.) + P400 e FUCO7,5+AVP100 mg/Kg + P400. Os valores representam a média \pm EPM, com n=5 a 8 animais, a vs Salina, b vs Salina+P400; com $p < 0,05$ (ANOVA seguido do teste de Bonferroni).

Figura 8 — Efeito do tratamento com FUCO sozinha e/ou em associação com AVP sobre a produção de substâncias ácidas reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) em córtex pré-frontal de camundongos tratados com P400.



Determinação da ocorrência de lipoperoxidação, com base na concentração de MDA, em animais tratados com salina, salina + P400, FUCO (7,5, 15 e 30 mg/Kg i.p.) + P400, AVP (100 e 400 mg/Kg i.p.) + P400 e FUCO7,5+AVP100 mg/Kg + P400. Os valores representam a média ± EPM, com n=5 a 8 animais, a vs Salina, b vs Salina+P400; com $p < 0,05$ (ANOVA seguido do teste de Bonferroni).

Figura 9 — Efeito do tratamento com FUCO sozinha e/ou em associação com AVP sobre a produção de substâncias ácidas reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) em corpo estriado de camundongos tratados com P400.



Determinação da ocorrência de lipoperoxidação, com base na concentração de MDA, em animais tratados com salina, salina + P400, FUCO (7,5, 15 e 30 mg/Kg i.p.) + P400, AVP (100 e 400 mg/Kg i.p.) + P400 e FUCO7,5+AVP100 mg/Kg + P400. Os valores representam a média ± EPM, a vs Salina, b vs Salina+P400, c vs FUCO7,5; com $p < 0,05$ (ANOVA seguido de pos-teste de Bonferroni).

5.2.2 Efeitos do pré-tratamento com fucoïdana sozinha e/ou em associação com ácido valpróico sobre a concentração de nitrito/nitrato nas áreas cerebrais de camundongos submetidos ao modelo de convulsão induzido por pilocarpina

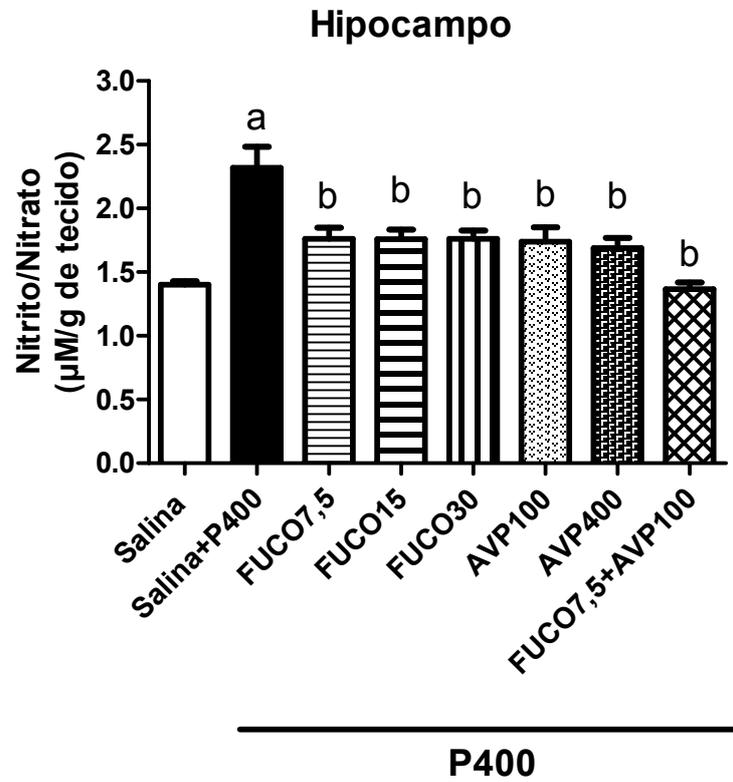
Houve um aumento de cerca de 65% na concentração de nitrito/nitrato no hipocampo dos animais que receberam pilocarpina quando comparado ao grupo SALINA. O pré-tratamento com fucoïdana nas doses de 7,5, 15 e 30 preveniu esse aumento. Observamos que FUCO 7,5 mg/kg e o AVP 100 mg/kg, tanto sozinhos como em associação promoveram uma diminuição dos níveis de nitrito/nitrato quando comparamos ao grupo tratado com SALINA+P400, entretanto na associação o percentual de diminuição foi maior (FUCO 7,5 mg/kg: 28%; AVP 100 mg/kg: 20%; FUCO 7,5 + AVP 100: 41%). [Hipocampo: SALINA: $1,402 \pm 0,02574$; SALINA+P400: $2,319 \pm 0,1636$; FUCO7,5+P400: $1,681 \pm 0,07453$; FUCO15+P400: $1,759 \pm 0,07453$; FUCO30+P400: $1,761 \pm 0,06645$; AVP 100+P400: $1,855 \pm 0,1160$; AVP400+P400: $1,689 \pm 0,07909$; AVP100+FUCO7,5+P400: $1,367 \pm 0,122$] (FIGURA 10).

Um aumento significativo na concentração de nitrito e nitrato foi verificado no córtex pré-frontal dos animais tratados apenas com pilocarpina quando comparado ao grupo SALINA. O pré-tratamento com fucoïdana nas três doses 7,5, 15 e 30 preveniu esse aumento. Observamos que FUCO 7,5 mg/Kg sozinha e em associação com ácido valpróico promoveu uma diminuição dos níveis de nitrito/nitrato quando comparados ao grupo tratado com SALINA+P400, entretanto esse efeito foi melhorado [Córtex pré-frontal: SALINA: $1,377 \pm 0,09353$; SALINA+P400: $2,275 \pm 0,06637$; FUCO: 7,5+P400 $1,591 \pm 0,02694$; FUCO15+P400: $1,674 \pm 0,03746$; FUCO30+P400: $1,721 \pm 0,05949$; AVP 100+P400: $1,881 \pm 0,07979$; AVP400+P400: $1,789 \pm 0,08846$; AVP100+FUCO7,5+P400: $1,452 \pm 0,09729$] (FIGURA 11).

Assim como foi observado no hipocampo e no córtex pré-frontal, houve um aumento na concentração de nitrito/nitrato no corpo estriado dos animais tratados apenas com pilocarpina quando comparado ao grupo SALINA. O pré-tratamento com fucoïdana nas doses de 7,5, 15 e 30 preveniu esse aumento. Observamos que a associação das doses da FUCO 7,5 mg/kg + AVP 100 mg/kg provocou uma diminuição dos níveis de nitrito/nitrato no corpo estriado dos animais quando comparamos ao grupo tratado com SALINA+P400 [Corpo estriado: SALINA: $1,409 \pm 0,04603$; SALINA+P400: $2,243 \pm 0,05228$; FUCO7,5+P400; $1,670 \pm 0,02642$; FUCO15+P400: $1,631 \pm 0,04254$; FUCO30+P400: $1,653 \pm 0,05330$; AVP100+P400:

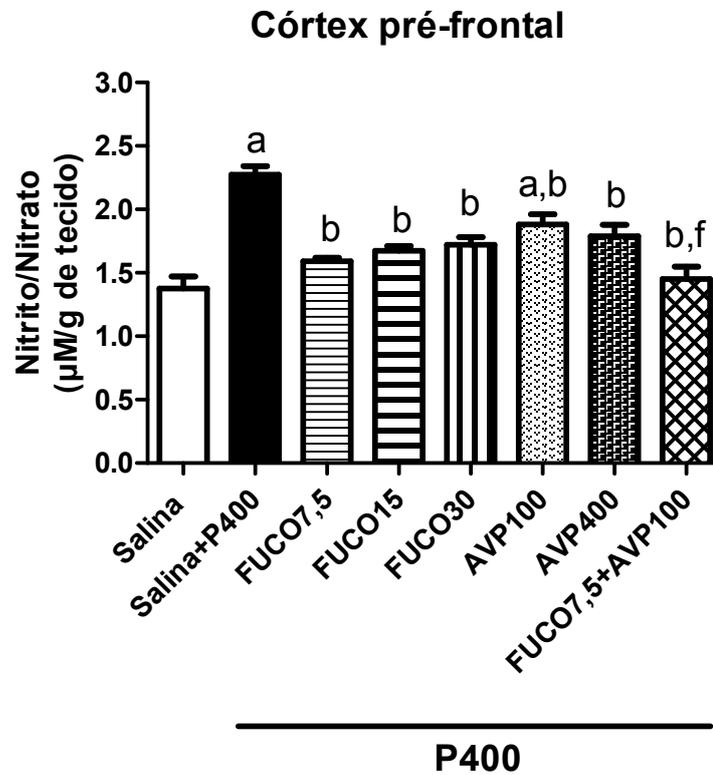
1,802 \pm 0,1168; AVP400+P400: 1,698 \pm 0,1600; AVP100+FUCO7,5+P400: 1,516 \pm 0,04885]
(FIGURA 12).

Figura 10 — Efeito do tratamento com Fucoïdãna sozinha e/ou em associação com ácido valpróico sobre a produção de n trito e n trato em hipocampo de camundongos submetidos   convulsão com Pilocarpina.



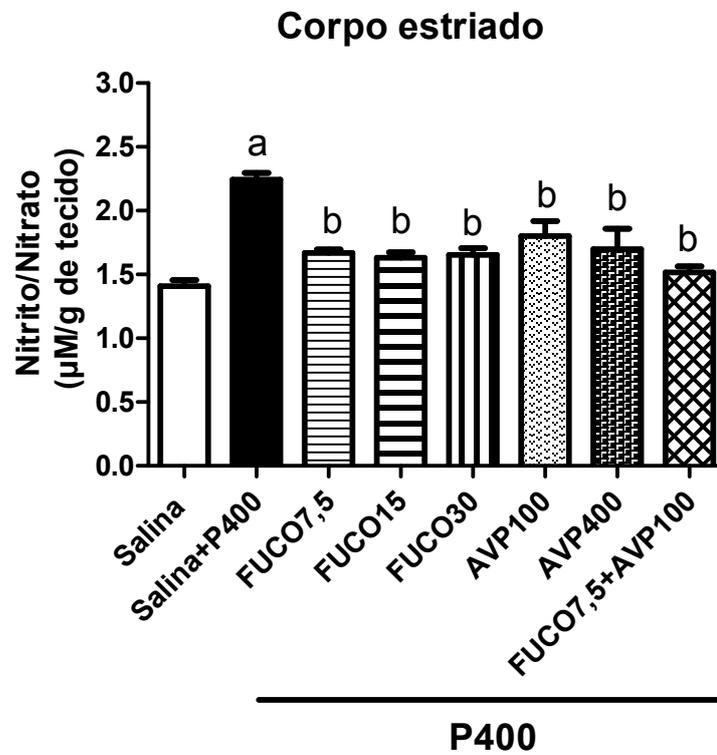
Determinação da ocorrência de estresse oxidativo, com base na concentração de n trito/nitrato, em animais tratados com salina, salina + P400, FUCO (7,5, 15 e 30 mg/Kg i.p.) + P400, AVP (100 e 400 mg/Kg i.p.) + P400 e FUCO7,5+AVP100 mg/Kg + P400. Os valores representam a média \pm EPM, $n=5-8$ animais, a vs Salina, b vs Salina+P400, com $p<0,05$ (ANOVA seguido do teste de Bonferroni).

Figura 11 — Efeito do tratamento com Fucoïdãna sozinha e/ou em associaçãõ com ácidõ valpróico sobre a produçãõ de nitrito e nitrato em córtex pré-frontal de camundongos submetidos à convulsãõ com Pilocarpina.



Determinaçãõ da ocorrênciã de estresse oxidativo, com base na concentraçãõ de nitrito/nitrato, em animais tratados com salina, salina + P400, FUCO (7,5, 15 e 30 mg/Kg i.p.) + P400, AVP (100 e 400 mg/Kg i.p.) + P400 e FUCO7,5+AVP100 mg/Kg + P400. Os valores representam a média \pm EPM, n=5-8, a vs salina, b vs Salina+P400, f vs AVP100, com $p < 0,05$ (ANOVA seguido do teste de Bonferroni).

Figura 12 — Efeito do tratamento com Fucoïdãna sozinha e/ou em associaçãõ com ácidõ valpróico sobre a produçãõ de nitrito e nitrato em corpõ estriado de camundongõs submetidos à convulsãõ com Pilocarpina.



Determinaçãõ da ocorrênciã de estresse oxidativo, com base na concentraçãõ de nitrito/nitrato, em animais tratados com salina, salina + P400, FUCO (7,5, 15 e 30 mg/Kg i.p.) + P400, AVP (100 e 400 mg/Kg i.p.) + P400 e FUCO7,5+AVP100 mg/Kg + P400. Os valores representam a mÃdia ± EPM, n=5-8, a vs Salina, b vs Salina+P400; com $p < 0,05$ (ANOVA seguido do teste de Bonferroni).

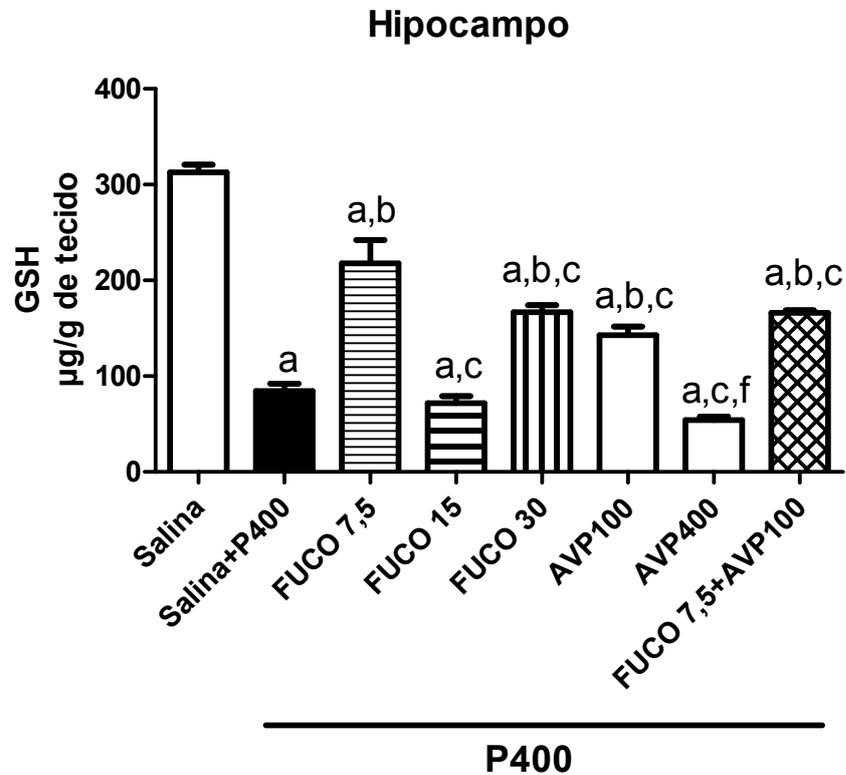
5.2.3 Efeito do tratamento com fucoïdانا sozinha e/ou em associação com ácido valpróico sobre a concentração de glutathiona reduzida nas áreas cerebrais de camundongos submetidos ao modelo de convulsão induzido por pilocarpina

Uma redução significativa na concentração de GSH foi observada no hipocampo dos animais tratados com PILO em relação aos controles (tratados apenas com salina). O pré-tratamento com FUCO nas doses de 7,5 e 30 mg/Kg foi capaz de reverter a redução dos níveis de GSH no hipocampo de animais induzidos a convulsão por P400. A associação da fucoïdانا na dose de 7,5 mg/kg com o ácido valpróico na dose de 100 mg/kg, promoveu recuperação dos níveis de GSH, enquantoo tratamento com ácido valpróico na dose de 400 mg/kg não apresentou efeito. SALINA [Corpo estriado: SALINA: $313,0 \pm 7,890$; SALINA+P400: $84,40 \pm 7,808$; FUCO7,5+P400: $217,9 \pm 24,32$; FUCO15+P400: $71,83 \pm 7,275$; FUCO30+P400 $166,8 \pm 7,348$; AVP100+P400: $142,9 \pm 8,965$; AVP400+P400: $54,33 \pm 3,571$; AVP100+FUCO7,5+P400: $166,3 \pm 2,423$] (FIGURA 13).

Houve redução na concentração de GSH no córtex pré-frontal dos animais tratados com PILO em relação aos controles (tratados apenas com salina). O pré-tratamento com FUCO na dose de 7,5 mg/Kg foi capaz de reverter essa redução, recuperando os níveis de GSH para valores próximos aos do controle (salina). Assim como observado no hipocampo, a associação da fucoïdانا na dose de 7,5 mg/kg com o ácido valpróico na dose de 100 mg/kg, recuperou os níveis de GSH, o que não foi observado com o tratamento com a dose de 400 mg/kg de ácido valpróico sozinho. SALINA [Corpo estriado: SALINA: $196,7 \pm 16,07$; SALINA+P400: $80,02 \pm 8,031$; FUCO7,5+P400 $221,0 \pm 17,06$; FUCO15+P400: $6,264 \pm 0,2307$; FUCO30+P400 $103,2 \pm 6,375$; AVP100+P400: $121,2 \pm 2,309$; AVP400+P400: $70,34 \pm 8,651$; AVP100+FUCO7,5+P400: $148,1 \pm 14,29$] (FIGURA 14).

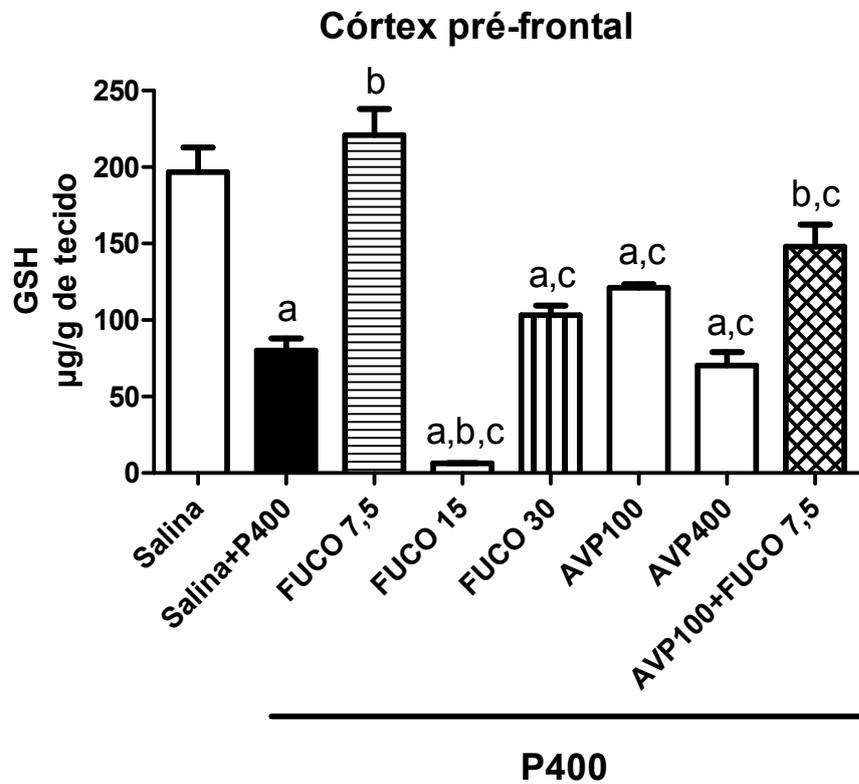
Foi observada uma redução na concentração de GSH no corpo estriado dos animais tratados com PILO em relação aos controles (tratados apenas com salina). Embora o pré-tratamento com FUCO na dose de 7,5 mg/kg e ácido valpróico na dose de 100 mg/kg não tenham sido capazes de reverter a redução de glutathiona induzida por P400, a sua associação foi capaz de recuperar os níveis de GSH. SALINA [Corpo estriado: SALINA: $130,2 \pm 17,54$; SALINA+P400: $125,5 \pm 5,443$; FUCO7,5+P400: $171,0 \pm 16,90$; FUCO15+P400: $71,75 \pm 7,400$; FUCO30+P400: $187,9 \pm 18,95$; AVP100+P400: $137,3 \pm 10,30$; AVP400+P400: $73,43 \pm 3,023$; AVP100+FUCO7,5+P400: $248,5 \pm 29,95$] (FIGURA 15).

Figura 13 — Efeito do tratamento com Fucoidana sozinha e/ou em associação com ácido valpróico sobre a determinação dos níveis de GSH em hipocampo de camundongos submetidos à convulsão com Pilocarpina.



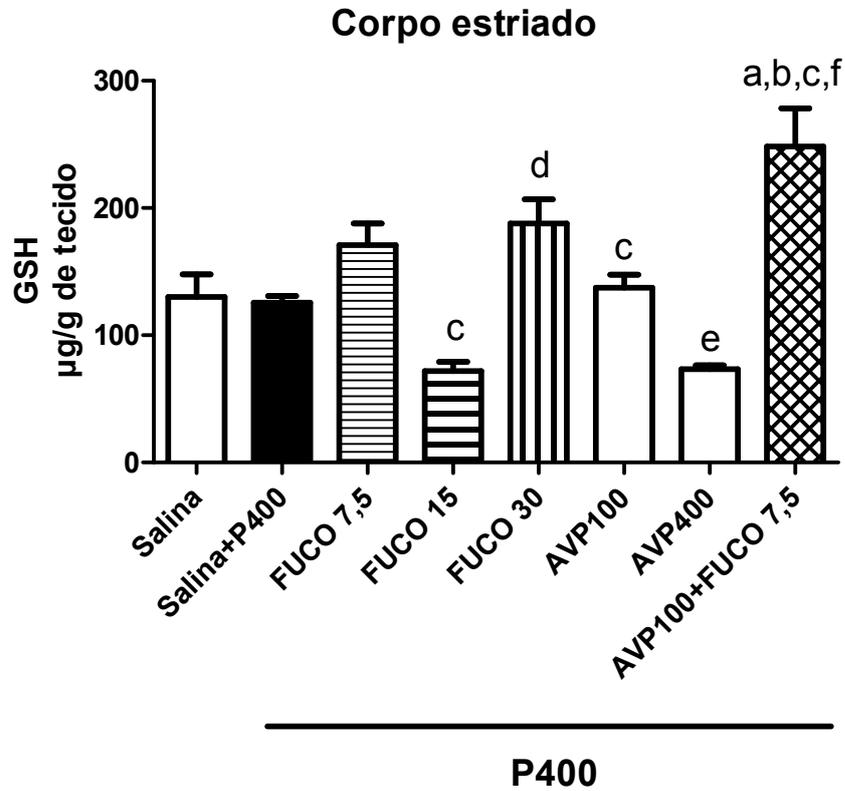
Determinação dos níveis de glutatona em hipocampo de camundongos submetidos ao modelo de convulsão com pilocarpina (400 mg/kg), em animais tratados com salina, salina + P400, FUCO (7,5, 15 e 30 mg/Kg i.p.) + P400, AVP (100 e 400 mg/Kg i.p.) + P400 e FUCO7,5+AVP100 mg/Kg + P400. Os valores representam a média \pm EPM, $n=5-8$, a vs Salina, b vs Salina+P400, c vs FUCO 7,5, f vs AVP100; com $p<0,05$ (ANOVA seguido do teste de Bonferroni).

Figura 14 — Efeito do tratamento com Fucoidana sozinha e/ou em associação com ácido valpróico sobre a determinação de GSH em córtex pré-frontal de camundongos submetidos à convulsão com Pilocarpina.



Determinação dos níveis de glutathione em córtex pré-frontal de camundongos submetidos ao modelo de convulsão com pilocarpina (400 mg/kg), em animais tratados com salina, salina + P400, FUCO (7,5, 15 e 30 mg/Kg i.p.) + P400, AVP (100 e 400 mg/Kg i.p.) + P400 e FUCO7,5+AVP100 mg/Kg + P400. Os valores representam a média \pm EPM, $n=5-8$, a vs Salina, b vs Salina+P400, c vs FUCO 7,5; com $p<0,05$ (ANOVA seguido do teste de Bonferroni).

Figura 15 — Efeito do tratamento com Fucoidana sozinha e/ou em associação com ácido valpróico sobre a determinação de GSH em corpo estriado de camundongos submetidos à convulsão com Pilocarpina.



Determinação dos níveis de glutatona em corpo estriado de camundongos submetidos ao modelo de convulsão com pilocarpina (400 mg/kg), em animais tratados com salina, salina + P400, FUCO (7,5, 15 e 30 mg/Kg i.p.) + P400, AVP (100 e 400 mg/Kg i.p.) + P400 e FUCO7,5+AVP100 mg/Kg + P400. Os valores representam a média \pm EPM, n=5-8, a vs Salina, b vs Salina+P400, c vs FUCO 7,5, d vs FUCO 15, e vs FUCO 30, f vs AVP100; com $p < 0,05$ (ANOVA seguido do teste de Bonferroni).

6 DISCUSSÃO

Nas últimas três décadas, os modelos animais utilizados na busca de novas DAEs têm se mostrado eficientes para a identificação de drogas potencialmente eficazes para o tratamento de epilepsia humana (BIALE; TWYMAN; WHITE, 2004). Um dos modelos mais utilizados é o modelo de convulsão induzido por pilocarpina, que mimetiza o tipo de epilepsia mais prevalente em seres humanos, que é a epilepsia do lobo temporal. A administração sistêmica de pilocarpina em roedores induz convulsões com foco de início no sistema límbico, principalmente no hipocampo, isso foi demonstrado através de experimentação comportamental e eletroencefalográfica (TURSKI *et al.*, 1983). É válido ressaltar que não encontramos nenhum trabalho utilizando a fucoidana em modelos animais de convulsão.

O presente estudo testou a fucoidana nas doses de 7,5, 15 e 30 mg/kg sozinha e em associação com uma droga antiepiléptica padrão, que é o ácido valpróico nas doses de 100 e 400 mg/kg no modelo de convulsão induzida por pilocarpina em camundongos. Os resultados demonstraram que nos grupos pré-tratados com fucoidana, houve proteção da convulsão ao ser observado aumento da latência de convulsão e de morte, quando comparado ao grupo controle PILO. Este aumento foi observado apenas nas maiores doses (15 e 30 mg/kg), e isso foi verificado tanto na latência de morte como na latência de convulsão.

Esses resultados demonstraram que o pré-tratamento com fucoidana nas doses analisadas foi capaz de reduzir a intensidade e a severidade das convulsões induzidas por pilocarpina em camundongos, provavelmente devido às propriedades antioxidantes da fucoidana, que já foram demonstradas em trabalhos anteriores utilizando outros modelos experimentais (KANG *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2014). Esses resultados sugerem um possível efeito protetor exercido pela fucoidana no SNC de camundongos submetidos ao modelo de convulsão com pilocarpina.

Estudos utilizando modelos animais de doenças neurodegenerativas como as doenças de Parkinson e Alzheimer, têm demonstrado que a fucoidana apresenta possíveis efeitos benéficos como antioxidante e anti-inflamatório (MEENAKSHI *et al.*, 2016; WOZNIAK *et al.*, 2015).

O ácido valpróico, um ácido graxo de cadeia curta ramificada, tem inúmeros mecanismos de ação que o torna uma droga antiepiléptica de amplo espectro e um dos medicamentos mais prescritos para epilepsia em todo o mundo. Objetivando determinar uma subdose e a dose anticonvulsivante do AVP, no modelo de convulsão a ser estudado, foram testadas as doses de 100, 200 e 400 mg/kg. Verificamos através dos resultados obtidos que a dose de 100 mg/kg poderia ser utilizada como uma subdose e a de 400mg/kg como a dose anticonvulsivante.

Em relação aos resultados obtidos da associação da fucoidana com o ácido valpróico, podemos observar uma melhora no efeito do AVP na proteção contra os danos ocasionados pela convulsão. Foi observado aumento da latência de convulsão e de morte quando comparado com o controle. Ao ser associado uma subdose de AVP (100 mg/kg), que não apresentou efeito significativo, com a menor dose da FUCO (7,5 mg/kg), verificamos uma potencial interação benéfica ao diminuirmos a concentração da droga e mesmo assim obtendo efeito. Sabemos que a maioria dos efeitos adversos dos antiepilépticos é dose-dependente, ou seja, a diminuição da dose do fármaco reduz a intensidade dos efeitos colaterais, assim como a necessidade de suspensão da droga (ALEXOPOULOS, 2013).

Embora mais estudos sejam necessários para confirmar os efeitos da associação, essa possível interação benéfica entre o AVP e a fucoidana, com melhora do efeito do AVP mesmo em subdose poderia proporcionar aos pacientes que necessitem utilizar o AVP, o uso de uma dose menor associada a esse antioxidante natural. Segundo estudos realizados com as DAEs comercializadas a utilização a longo prazo desses fármacos causam efeitos colaterais, como o aumento do estresse oxidativo (MARTINC, GRABNAR e VOVK, 2012), que poderiam ser reduzidos pela associação com a fucoidana, um antioxidante natural.

O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre a produção de EROs, ERNs, e a capacidade de desintoxicar prontamente os intermediários reativos num sistema biológico. A geração excessiva de EROs pode causar danos de células neuronais inclusive morte celular, através de uma via apoptótica ou necrótica. Evidências recentes sugerem uma ligação íntima entre o estresse oxidativo e disfunção mitocondrial com o desenvolvimento da morte neuronal em diversas doenças neurológicas, incluindo a epilepsia (ARMENTA *et al.*, 2014).

Observamos nesse estudo que ocorreu um aumento da concentração de MDA e nitrito/nitrato em todas as áreas estudadas dos animais submetidos a convulsão por pilocarpina. Já está bem documentado que o estresse oxidativo verdadeiramente aumenta durante as convulsões induzidas por pilocarpina, sinalizando que o dano cerebral induzido pelo processo oxidativo desempenha um papel crucial na fisiopatologia das convulsões (NEJM M *et al.*, 2015).

Por outro lado, nos animais tratados com fucoidana observamos uma diminuição das concentrações de MDA nas diferentes áreas analisadas. Observamos ainda que a associação da menor dose de fucoidana (7,5 mg/kg) com a subdose do AVP (100 mg/kg) melhorou o efeito do ácido valpróico nessa dose, apresentando efeito no hipocampo dos animais. No córtex pré-frontal dos animais a associação AVP100+FUCO7,5, também observamos uma melhora do efeito do AVP na subdose analisada. No corpo estriado observamos na associação AVP100+FUCO7,5 uma diminuição na concentração de MDA, a níveis semelhantes ao controle SALINA. Sugerimos, pois, que uma possível interação dessas drogas pode apresentar efeito benéfico com a redução da dose do AVP, proporcionando assim a possibilidade da obtenção do efeito terapêutico com a redução dos efeitos colaterais relacionados a dose.

Com relação a atividade antioxidante exercida por polissacarídeos extraídos a partir de algas, Yang e colaboradores (2011) demonstraram que os polissacarídeos sulfatados de algas pardas apresentaram atividade antioxidante, em experimento realizado *in vitro* com polissacarídeos sulfatados extraídos a partir da alga *Corallina officinalis*. Eles concluíram que as frações de polissacarídeos isoladas apresentaram forte efeito inativador de radicais livres como o radical superóxido, o radical hidroxil e o DPPH (2,2-Difenil-1-picril-hidrazila). Além disso, sugeriram a possível utilidade desses polissacarídeos extraídos de algas como agentes terapêuticos.

Nossos resultados demonstraram que o pré-tratamento com fucoidana foi capaz de reduzir significativamente o nível de peroxidação lipídica quando comparado com o grupo controle SALINA+P400. Recentemente, Meenakshi e colaboradores (2016) demonstraram que o tratamento com fucoidana extraída a partir da alga parda *Turbinaria decurrens* reduziu a peroxidação lipídica em áreas cerebrais de animais submetidos ao modelo de doença de Parkinson com 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), eles concluíram que esse efeito antioxidante poderia estar associado a uma possível ação neuroprotetora.

Observamos ainda aumento do estresse oxidativo demonstrado através da elevação da concentração de nitrito/nitrato no hipocampo, córtex pré-frontal e corpo estriado dos animais tratados com P400 em relação ao controle. Nas doses analisadas da fucoïdana observamos diminuição dos níveis de nitrito/nitrato nas diferentes áreas analisadas, A associação da fucoïdana 7,5 mg/kg com o AVP 100 mg/kg no córtex pré-frontal melhorou o efeito do ácido valpróico nessa dose reduzindo a produção de nitrito/nitrato a níveis próximos do controle SALINA.

Além disso, foi verificada uma diminuição nos níveis de GSH, no hipocampo, córtex pré-frontal e corpo estriado dos animais tratados com P400 em relação ao controle. Nas doses analisadas do pré-tratamento com fucoïdana observamos que a recuperação dos níveis de GSH dependeu das doses testadas e da área cerebral estudada, onde no hipocampo apenas as doses de 7,5 e 30 reverteram a diminuição da concentração de GSH, no córtex pré-frontal apenas a dose de 7,5 reverteu a diminuição dos níveis de GSH e no corpo estriado não observamos reversão dos níveis de GSH.

Corroborando com os nossos resultados Gao e colaboradores (2012) demonstraram que a fucoïdana extraída a partir da alga parda *Laminaria japonica* foi capaz de reverter a diminuição de GSH provocada pelo H₂O₂. Demonstrando que parte do efeito antioxidante exercido pela fucoïdana, se dá através da modulação de sistemas antioxidantes endógenos como oGSH.

Verificamos que em áreas como hipocampo e córtex-pré-frontal a associação da FUCO 7,5 + AVP 100, apresentou resultado melhor do que o observado com ácido valpróico sozinho na dose anticonvulsivante (400 mg/kg). No corpo estriado essa associação foi capaz de melhorar o efeito do ácido valpróico na subdose analisada (100 mg/kg). Esse efeito ocorreu provavelmente devido as ações da fucoïdana, entre elas a atividade antioxidante analisada neste trabalho.

Os efeitos antioxidantes e provavelmente protetores da fucoïdana já vêm sendo demonstrados em trabalhos anteriores, utilizando outros modelos experimentais. Heeba e Morsy (2015), por exemplo, verificaram que o tratamento com fucoïdana durante 4 semanas melhorou o quadro de hepatite e a resistência a insulina em modelo experimental de doença hepática não-alcóolica em ratos. Foi observado que a fucoïdana reduziu níveis de MDA e óxido nítrico, recuperou os níveis de GSH e reduziu a expressão de RNAm para citocinas pró-

inflamatórias. Esses pesquisadores concluíram que os efeitos benéficos observados da fucoïdana podem estar relacionados pelo menos em parte, às suas ações antioxidantes e antiinflamatórias.

No presente trabalho o pré-tratamento com fucoïdana foi capaz de reduzir os danos neuronais provocados pela pilocarpina, diminuindo a intensidade das convulsões e aumentando a latência de morte dos animais, esses efeitos podem estar relacionados à atividade antioxidante da fucoïdana, observada através da redução da peroxidação lipídica e do estresse oxidativo ocasionado pela administração de PILO na dose de 400 mg/kg.

Observamos que a associação da fucoïdana com o ácido valproico apresentou melhora do efeito desse anticonvulsivante convencional, mesmotendo sido este usado em uma subdose. Esse efeito apresenta grande potencial benéfico no tratamento de pacientes que necessitem utilizar este medicamento, pois poderá possibilitar a redução da dose desse anticonvulsivante quando associado ao antioxidante natural, com manutenção do efeito terapêutico e conseqüente redução dos efeitos colaterais e portanto melhor tolerabilidade e adesão ao tratamento por parte dos pacientes.

Observamos em nossos resultados que no teste comportamental a fucoïdana em sua dose (7,5 mg/Kg) não apresentou efeito significativo, quando comparado com o controle PILO, mas apresentou na avaliação do estresse oxidativo. Sugerimos, pois, que não apenas o estresse oxidativo é responsável pelo seu efeito, outros mecanismos podem estarem envolvidos com seu efeito. Portanto mais estudos devem ser realizados com esse modelo para determinação do potencial do polissacarídeo fucoïdana.

7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos sugerem que a fucoïdana apresentou atividade antioxidante, exercendo, portanto, uma possível neuroproteção no modelo de convulsão induzido por pilocarpina, provavelmente devido a redução do estresse oxidativo observado. Sugerimos ainda que a fucoïdana pode ser considerada um potencial adjuvante no tratamento da epilepsia, pois observamos que sua associação a uma subdose do AVP, melhorou o efeito do mesmo. No entanto, são necessários mais estudos com o polissacarídeo fucoïdana para comprovar esse efeito.

REFERÊNCIAS

- ALEXOPOULOS, A. V. Pharmacoresistant epilepsy: Definition and explanation. **Epileptology**, p. 38-42, v.1, 2013.
- APRIOKU, J. S. Pharmacology of free radicals and impact of reactive oxygen species on the testis. **Journal Reprod infertile**, p.158-172, v. 14, 2013.
- ARMENTA, M. M.; RUÍZ, C. N.; REBOLLAR, D. J.; MARTÍNEZ, E. R.; GÓMEZ, P. Y. Oxidative Stress Associated with Neuronal Apoptosis in Experimental Models of Epilepsy, **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, p.1-12, v. 2014, 2014.
- BANERJEE, P. N.; FILIPPI, D.; HAUSER, W. A. The descriptive epidemiology of epilepsy- A review. **Epilepsy Research**, p.31-45, v. 85, 2009.
- BHAKUNI, D. S.; RAWAT, D. S. Bioactivit Marine natural Products. Nova Delhi, **Anamaya Publishers**, 2005.
- BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Free radicals and the main dietary antioxidants. **Revista Nutrição Campinas**, p. 123-130, v. 12, 1999.
- BIALE, R. M.; TWYMAN, R.E.; WHITE, H.S. Correlation analysis between anticonvulsant-ED50 values of antiepileptic drugs in mice and rats and their therapeutic doses and plasma levels. **Epilepsy Behav**, p. 866-872, v. 5, 2004.
- BRODIE, M. J.; DICHTER, M. A. New antiepileptic drugs. **The New England Journal of Medicine**, p. 1583-90, v. 24, 1996.
- CAVALHEIRO, E. A. The pilocarpine model of epilepsy. **Italian Journal of Neurological Sciences**, p. 33-37, v. 16, 1995.
- CAVALHEIRO, E. A., FERNANDES, M. J., TURSKI, L., NAFFAH-MAZZACORATTI, M. G. Spontaneous recurrent seizures in rats: amino acid and monoamine determination in the hippocampus. **Epilepsia**, p.1-11, v. 35, 1994.
- CAVALHEIRO, E. A.; BELLÍSSIMO, M. I.; NAFFAH-MAZZACORATTI, M. G. Profile of prostaglandin levels in the rat hippocampus in pilocarpine model of epilepsy. **Neurochemical**, p.461-466, v. 27, 1995.
- CECILIE, U.; JOHANNESSEN, A.; DIRK, P.; FRODE F.; BJØRNAR H. The acute effect of valproate on cerebral energy metabolism in mice. **Epilepsy Research**, p. 247-256, v. 47, 2002.
- CLIFFORD, D. B.; OLNEY, J. W.; MANIOTIS, A.; COLLINS, R. C.; ZORUMSKI, C. F. The functional anatomy and pathology of lithium-pilocarpine and high-dose pilocarpine seizures. **Neuroscience**, p. 953-968, v. 23, 1987.
- COSTA, J. C.; OLIVEIRA M. L. K.; PANTA R. M. G. Epilepsia na Infância. **Acta Médica ATM**, p. 142-79, v. 142, 1982.

CUI, Y. Q.; JIA, Y. J.; ZHANG, T.; ZHANG, Q. B.; WANG, X. M. Fucoidan Protects against Lipopolysaccharide-Induced Rat Neuronal Damage and Inhibits the Production of Proinflammatory Mediators in Primary Microglia. **Neurosciences e Therapeutics**, p. 827-833, v. 18, 2012.

CZAPIŃSKI, P.; BLASZCZYK, B.; CZUCZWAR, S. J. Mechanisms of action of antiepileptic drugs. **Topics in Medicinal Chemistry**, p. 3–14, v. 5, 2005.

DO, H.; PYO, S.; Sohn, E. H. Suppression of iNOS expression by fucoidan is mediated by regulation of p38 MAPK, JAK/STAT, AP-1 and IRF-1, and depends on up-regulation of scavenger receptor B1 expression in TNF- α - and IFN- γ -stimulated C6 glioma cells. **Journal of Nutritional Biochemistry**, p. 671-679, v. 21, 2010.

DE LORENZO, R. J.; RAZA, M.; PAL, S.; RAFIQ, A. Long-term alteration of calcium homeostatic mechanisms in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. **Brain Research**, p. 1-12, v. 903, 2001.

DRAPER, H.H.; HADELY, M. Malondialdehyde determination as na index of lipid peroxidation. **Methods Enzymol**, p. 421-431, v. 186, 1990.

ENGEL, J.; PEDLEY, T. A comprehensive the-book. Lippincott-Raven, Philadelphia. **Epilepsy**, 1997.

FRANTSEVA, M. V.; PEREZ VELAZQUEZ, J. L.; HWANG, P. A.; CARLEN, P.L. Free radical production correlates with cell death in na vitro modelo f experimental epilepsy. **Epilepsy Research**, p. 66-71, 2000.

FREITAS, R. M. Behavioural and neurochemical alterations during the acute phase of convulsive process induced by pilocarpine. **Revista Eletrônica de farmácia**, p.60-70, v. 3, 2008.

FUJIMOTO, K.; KANEDA, T. Screening test for antioxidigenic compounds from marine algae and fraction from *Eisenia bicyclis* and *Undaria pinnatifida*. **Bull Japan Soc Sci Fisheries**, p.1125-1130, v. 46, 1980.

GAO, Y.; DONG, C.; YIN, J. SHEN, J.; TIAN, J.; LI, C. Neuroprotective Effect of Fucoidan on H₂O₂-Induced Apoptosis in PC12 Cells Via Activation of PI3K/Akt Pathway. **Cellular and Molecular Neurobiology**, p. 523-529, v. 32, 2012.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER P. L.; WISHNOK J. S., TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and (15N) nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, p. 131-138, v. 126, 1982.

GUEDES, F. A.; ALONSO, O. Y. G.; LEITE, J. P. Plasticidade Neuronal Associada à Epilepsia do Lobo Temporal Mesial: Insights a partir de Estudos em Humanos e em Modelos Animais. **Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology**, p. 10-17, v. 12, 2006.

HEEBA, G. H.; MORSY, M. A. Fucoidan amelioratessteato hepatitisand insulinresistance by suppressing oxidative stress andinflammatory cytokinesin experimental non alcoholic fatty liverdisease. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, p. 907-914, v. 40, 2015.

- HUANG, C. Y.; WU, S. J.; YANG, W. N.; KUAN, A. W.; CHEN, C. Y. Antioxidant activities of crude extracts of fucoidan extracted from *Sargassum glaucescens* by a compressional-puffing-hydrothermal extraction process. **Food Chemistry**, p. 1121-1129, v. 197, 2016.
- ILHAN, A.; ALADAG, M. A.; BOLUX, A.; ARMUCU, F. E. Erdosterine ameliorates PTZ-induced oxidative stress in mice seizure model. **Brain Research bulletin**, p. 495-499, 2005.
- JIN, D. Q.; LIM, C. S.; SUNG, J. Y.; CHOI, H. G.; HÁ, I.; HAN, J. S. *Ulva conglobata*, a marine algae, has neuroprotective and anti-inflammatory effects in murine hippocampal and microglial cells. **Neuroscience Letters**, p. 154–158, v.402, 2006.
- KANG, S. M.; KIM, K. N.; LEE, S. H.; AHN, G.; CHA, S. H.; KIM, A. D. Antiinflammatory activity of polysaccharide purified from AMG-assistant extract of *Ecklonia cava* in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. **Carbohydrate Polymers**, p.80-85, v. 85, 2011.
- KILINÇ, B.; CIRIK, S.; TURAN, G.; TEKOGUL, H.; KORU, E. **Seaweeds for Food and Industrial Applications**, 2013. Disponível em: http://cdn.intechopen.com/pdfs/41694/InTechSeaweeds_for_food_and_industrial_applications.pdf. Acesso em: 06.05.16.
- KOSHAL, P.; KUMAR, P. Effect of Liraglutide on Corneal Kindling Epilepsy Induced Depression and Cognitive Impairment in Mice. **Neurochemical Research - Springer**, p. 1741–1750, v. 41, 2016.
- KULKARNI, S. K., GEORGE, B. Lithium-pilocarpine neurotoxicity: a potential model of status epilepticus. **Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology**, p. 551-567, v. 17, 1995.
- LABANDEIRA-GARCIA, J. L.; TOBIO, J. P.; GUERRA, M. J. Compararison between normal developing striatum and developing striatall grafts using drug-induced Fos expression and neuron-specific enolase immunohistochemistry. **Neuroscience**, p.399-415, v. 60, 1994.
- LEE, S. K. Old versus New: Why do we need new antiepileptic drugs? **Joenal of epilepsy research**, p. 39-44, v. 4, 2014.
- LEITE, J. P.; BORTOLOTTIO, Z.A.; CAVALHEIRO, E.A. Spontaneous recurrent seizures in rats: an experimental model of partial epilepsy. **Neuroscience BiobehavioralReviews**, p. 511-7, v. 14, 1990.
- MIN L. L.; J.W.; SANDER, A. S. Projeto demonstrativo em epilepsia no brasil. **Arquivo Neuropsiquiatro**, p. 153-156, v. 61, 2003.
- LIU, F.;HAVENS, J.;YU, Q.;WANG, G.; DAVISSON, R. L.; PICKEL, V. M.; IADECOLA, C.The link between angiotensin II-mediated anxiety and mood disorders with NADPH oxidase-induced oxidative stress.**International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology**,p. 28-35, v. 4, 2012.

LONGATO, C. R. **Avaliação neuropsicológica e afetiva de crianças e adolescentes com epilepsia.** Dissertação de mestrado apresentado ao programa de pós-graduação em Psicologia. 2015.

LOSCHER, W. “Basic pharmacology of valproate: a review after 35 years of clinical use for the treatment of epilepsy,” **CNS Drugs**, p. 669–694, v. 16, 2002.

MARINHO, M. M. F.; SOUSA, F.C.F.; BRUIN, V. M. S.; VALE, M. R.; VIANA, G. S. B. Effects of lithium, alone or associated with pilocarpine, on muscarinic and dopaminergic receptors and on phosphoinositide metabolism in rat hippocampus and striatum. **Neurochemistry International**, p. 299-306, v. 33, 1998.

MARINHO, M. F.; BRUIN, V. M. S.; SOUSA, F. C. F.; AGUIAR, L. M.V.; PINHO, R. S. N.; VIANA, G. S. B. Inhibitory action of a calcium channel blocker (nimodipine) on seizures and brain damage induced by pilocarpine and lithium-pilocarpine in rats. **Neuroscience Letters**, p. 13–16, v. 235, 1997.

MARTINC, B.; GRABNAR, I.; VOVK, T. Antioxidants as a Preventive Treatment for Epileptic Process: A Review of the Current Status. **Current Neuropharmacology**, p.527-550, v. 12, 2014.

MARTINC, B.; GRABNAR I.; VOVK, T. O papel de espécies reativas em epileptogênese e influência da terapia anti-epiléptico sobre o estresse oxidativo. **Neurofarmacologia atual**, p. 328-343, 2012.

MEGIDDO, I.; COLSON, A.; CHISHOLM, D.; DUA, T.; NANDI, A.; LAXMINARAYAN, R. Health and economic benefits of public financing of epilepsy treatment in India: An agent-based simulation model epilepsy. **Full-Length Original Research**, p. 1-11, v. 57, 2016.

MEHVARI, J.; MOTLAGH, F. G.; NAJAFI, M.; GHAZVINI, M. R. A.; NAEINI, A. A.; ZARE, M. Effects of Vitamin E on seizure frequency, electroencephalogram findings, and oxidative stress status of refractory epileptic patients. **Advanced Biomedical Research**, p.1-36, v. 5, 2016.

MENEZES C. E. M. B. M. **As algas do Brasil**, p. 49-60, 2010.

MEENAKSHI, S.; UMayAPARVATHI, S.; SARAVANAN, R.; MANIVASAGAM, T. BALASUBRAMANIAN, T. Neuroprotective effect of fucoidan from *Turbinaria decurrens* in MPTP intoxicated Parkinsonic mice. **International Journal of Biological Macromolecules**, p. 425–433, v. 86, 2016.

MONA, F.; AZAB, E.; MOUSTAFA, Y. M. Influence of calcium channel blockers on anticonvulsant and antinociceptive activities of valproic acid in pentylenetetrazole-kindled mice. **Pharmacological Reports**, p. 305-14, v. 64, 2012.

NEJM M, B.; HAIDAR, A. A.; MARQUES, M. J.; HIRATA, A. E.; NOGUEIRA, F. N.; CAVALHEIRO, E. A.; SCORZA, F. A.; CYSNEIROS, R. M. Fish oil provides protection against the oxidative stress in pilocarpine model of epilepsy. **Metabolic Brain Disease**, p. 903-909, v. 30, 2015

NETO, J. G.; MARCHETTI, R. L. Epidemiologic aspects and relevance of mental disorders associated with epilepsy. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, p. 323-8, v. 27, 2005.

OLIVEIRA, A. A. **Novos aspectos da ação de drogas antiepilépticas: efeitos antioxidantes e modulação dos sistemas colinérgico e dopaminérgico**, Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Farmacologia, 2010.

PAREDES, G. Recent Advances in the Neurochemistry of Epilepsy. **Epilepsy**, p. 96-98, 2008.

PARYS, S.; KEHRAUS, S.; KRICK, A.; GLOMBITZA, K. W.; CARMELI, S.; KLIMO, K.; GERHÄUSER, C.; KÖNIG, G. M. In vitro chemopreventive potential of fucophlorethols from the brown alga *Fucus vesiculosus* L. by anti-oxidant activity and inhibition of selected cytochrome P450 enzymes, **Phytochemistry**, p. 221-229, v. 71, 2010.

PEPEU, G. Brain acetylcholine: an inventory of our knowledge on the 50th anniversary of its discovery. **Trends Pharmacol. Sci.**, p. 416-418, v. 5, 1983.

PUTTACHARY, S.; SHARMA, S.; STARK, S. THIPPESWAMY, T. Seizure-induced oxidative Stress in temporal lobe epilepsy. **Bio Med Research International**, p. 1-20, v. 2015, 2015.

RAMOS, S. F. **Avaliação dos efeitos bioquímicos e comportamentais do neuropeptídeo s em camundongos tratados com pentilenotetrazol**, dissertação de mestrado, Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, 2009.

RICHARDSON, J.; BÉLAND, J. Nonadrenergic inhibitory nervous system in human airways. **Journal of Applied Physiology**, p. 764-771, v. 41, 1996.

ROCHA, H. A. O.; FARIAS, E. H. C.; BEZERRA, L. C. L.; ALBUQUERQUE, I. R. L.; MEDEIROS, V. P.; QUEIROZ, K. C. S.; LEITE, E. L. Polissacarídeo sulfatado de algas marinhas com atividade anticoagulante. **Revista infarma**, p. 82-87, v. 16, 2004.

ROSA, J. M. **Estudo do mecanismo de ação antidepressiva da glutatona em camundongos**. Dissertação de mestrado (Mestrado em neurociências) - Universidade federal de Santa Catarina, 2007.

ROWLEY, S.; P LIANG, L.; FULTON, R.; SHIMIZU, T.; DAY, B.; PATEL, M. Mitochondrial respiration deficits driven by reactive oxygen species in experimental temporal lobe epilepsy. **Neurobiology of Disease**, p 151–158, v. 75, 2015.

SANTOS, H. S. W. M. de S.; CRUZ, W. M. de S. The Antioxidant Terapy and the chemotherapy treatment in oncology. **Revista Brasileira de cancerologia**, p. 303-308, v.47, 2001.

SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA, A. R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico, **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, p, 308-313, v. 10, 2004.

SELDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total protein bound and nonprotein sulphhydryl groups in tissues with Ellman's reagent. **Anal. Biochem**, p. 192-205, v. 25, 1988.

SHEKH-AHMAD, T.; BIALER, M.; YAVIN, E. Synthesis and anticonvulsant evaluation of dimethylethanolamine analogues of valproic acid and its tetramethylcyclopropyl analogue. **Epilepsy Research**, p. 238-246, v. 98, 2012.

SHIN, E. J.; JEONG, J. H.; CHUNG, Y. H.; KIM, W. K.; KO, K. H.; BACH, J. H.; HONG, J. S.; YONEDA, Y.; KIM, H. C. Role of oxidative stress in epileptic seizures. **Neurochemistry International**, p. 122-137, v. 59, 2011.

SIES, H. Strategies of antioxidant defence. Review. **European Journal of Biochemistry, Berlin**, p.213-219, v. 215, 1993.

SILVA, A. V.; CAVALHEIRO, E. A. Epilepsia: uma janela para o cérebro. **A mente humana**, 2004.

SILVA, L. H. A. C.; MATTA, C. B. B.; ARAÚJO, M. V.; BARBOSA-FILHO, J. M.; LIRA, D. P.; SANTOS, B. V.; MIRANDA, G. E. C.; MOREIRA, M. S. A. Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activities of Crude Methanolic Extract of Red Alga *Bryothamnion triquetrum*, **Marine Drugs**, p. 1977-1992, v. 8, 2012.

SILVA, A. P. S. C. L.; SILVA, J. C. C. L.; FREITAS, R. M. utilização de plantas medicinais no tratamento e/ou prevenção da epilepsia: uma prospecção tecnológica, *Revista GEINTEC*, 4(2): p. 876-883, v. 4, 2014.

SILVA, I. C. B. **Análise do perfil da metilação da região promotora dos genes BDNF e SLC6A4 em pacientes com epilepsia do lobo temporal**. Tese de doutorado em ciências médicas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2015.

STEPHEN, T.M.; CORCORAN, M.E. Catecholamines and convulsions. **Brain Research**, p. 497-507, v. 170, 1979.

TIWARI, A. K. Imbalance in antioxidant defense and human diseases: Multiple approach of natural antioxidants therapy. **Current Science**, p. 1179-1187, v. 81, 2011.

TURSKI, W. A.; CAVALHEIRO, E. A.; SCHWARZ, M.; CZUCZWAR, S. L. J.; KLEINROK, Z.; TURSKI, L. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. **Behavioural Brain Research**, p.315-35, v. 9, 1983a.

TURSKI, W. A.; CZUCZWAR, S. J. KLEINRROK, Z.; TURSKI, L. Cholinomimetics produce seizure and damage in rats. *Experientia*, p. 1408-1411, v. 39, 1983b.

TUTANC, M.; ARAS, M.; DOKUYUCU, R.; ZEREN, C.; ARICA, V.; OZTURK, O. H.; MOTOR, YIIMAZ, C. Oxidative Status in Epileptic Children Using Carbamazepine, **Iranian Journal of Pediatrics**, p. 1-4, v. 25, 2015.

VASCONCELOS, A. G., ARAÚJO, K. V., SANTANA L. A. B. Polissacarídeos extraídos de algas marinhas e suas aplicações biotecnológicas: uma revisão. **Revista Brasileira de Inovação Tecnológica em Saúde, On-Line**, p. 27-51, v. 5. 2015.

VAZQUEZ, M.; FAGIOLINO, P.; MALDONADO, C.; OLMOS, I.; IBARRA, M. S. ALVARIZA, S.; GUEVARA, N.; MAGALLANES, L.; OLANO, I. Hyperammonemia Associated with Valproic Acid Concentrations. **BioMed Research International**, p. 1-7, v. 2014, 2014.

VERBITSKY, M.; ROTHLIN, C. V.; Katz, E.; Elgoyhen, A. B. Mixed nicotinic–muscarinic properties of the $\alpha 9$ nicotinic cholinergic receptor. **Neuropharmacology**, p. 2515-2524, v. 39, 2000.

VEZZANI, A.; GRANATA, T. Brain inflammation in epilepsy: experimental and clinical evidence. **Epilepsia**, p. 1724-1743, v. 46, 2005.

VIVAS, L.; RATTRAY L.; STEWART, L.; BONGARD, E.; ROBINSON, B.L.; PETERS, W.; CROFT, S. L. Anti-malarial efficacy of pyronaridine and artesunate in combination in vitro and in vivo. **Acta Tropica**, p. 222-228, v. 105, 2008.

WADDINGTON, J. L.; O'BOYLE K. M. Drugs acting on brain dopamine receptors: a conceptual re-evaluation five years after the first selective D1 antagonist. **Clin Pharmacol Ther**, 1-52, v. 43, 1989.

WAHAB, A. Difficulties in treatment and management of epilepsy and Challenges in new drug development. **Pharmaceutical**, p. 2090-2110, v. 3, 2010.

WALDBAUM, S., PATEL, M. Mitochondria, oxidative stress, and temporal lobe epilepsy. **Epilepsy Research**, p. 23-45, v. 88, 2010.

WALTZ, J. C. F., MOREIRA, J. C. F. BENFATO, M. S., QUEVEDO, N.; VIVANNA, M. M. R., KLAMT, F., DAL-PIZZOL. F. Lipid peroxidation in hipocampus early and late after status epilepticus induced by pilocarpine of kainic acid in Wister rats. **Neuroscience Letters**, p.179-182, v. 291, 2000.

WOZNIAK, M.; BELL, T.; DÉNES, Á.; FALSHAW, R.; ITZHAKI, R. Anti-HSV1 activity of brown algal polysaccharides and possible relevance to the treatment of Alzheimer's disease. **Jornal Biol Macromol**, p. 530-540, 2015.

WIJESINGHE, W. A. J. P.; JEON, Y. J. Biological activities and potential industrial applications of fucose rich sulfated polysaccharides and fucoidans isolated from brown seaweeds: a review. **Rvista Carbohydrate Polymers**, p. 13-20, v. 88, 2012.

WHO Carbamazepine In Childhood Epilepsy. The World Health Organization. Report prepared for the World Health Organization. 2006. Available from: <http://archives.who.int/eml/expcom/expcom15/applications/paediatrics/formulations/Carbamazepine.pdf>.

White, H. S.; Smith, M. D.; Wilcox, K. S. Mechanisms of action of antiepileptic drugs. **International Review of Neurobiology**, p. 85-110, v. 81, 2007.

YANG, Y.; LIU, D.; WU, J.; CHEN, Y.; WANG, S. In vitro antioxidant activities of sulfated polysaccharide fractions extracted from *Corallina officinalis*. **Revista International Journal of Biological Macromolecules**, p. 2-7, v. 49, 2011.

ZENG, L. H.; ZHANG, H. D.; XU, C. J.; BIAN, Y. J.; XU, X. J.; XIE, M. Q.; ZHANG, R. H. Neuroprotective effects of flavonoids extracted from licorice on kainate-induced seizure in mice through their antioxidant properties. **Journal of Zhejiang University-SCIENCE B**, p. 1004–1012, v. 14, 2013.

ANEXO — DECLARACAO DE APROVAÇÃO DO PROJETO NO COMITÊ DE ÉTICA



Universidade Federal do Ceará – Campus Sobral
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA
Rua: Av. Comte. Misaelillo Rocha Pontes, 160, Derby
CEP: 62.042-280 Sobral-CE
Fone/Fax: (85) 3611.8000

DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº 04/2015, sobre o projeto intitulado: **Estudo dos efeitos do polissacarídeo sulfatado de alga parda (fucoidana) no modelo de convulsão induzido por pilocarpina em camundongos**, de responsabilidade do (a) Prof.(a) Dr.(a) **Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Conselho Nacional na Ciência e Experimentação Animal (CONCEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais(CEUA), em reunião realizada em 11 de agosto de 2015.

Sobral, 14 de agosto de 2015

Profa. Dra. Mirna Marques Bezerra

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA