



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACUDADE DE MEDICINA (CAMPUS-SOBRAL)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

FRANCISCA VALÉRIA BEZERRA SAMPAIO MARQUES

**EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO E NEUROPROTETOR DA FUCOIDANA
SOZINHA OU ASSOCIADA AO ÁCIDO VALPRÓICO NO MODELO DE
CONVULSÃO INDUZIDO POR PILOCARPINA EM CAMUNDONGOS**

SOBRAL – CE

2020

FRANCISCA VALÉRIA BEZERRA SAMPAIO MARQUES

**EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO E NEUROPROTETOR DA FUCOIDANA
SOZINHA OU ASSOCIADA AO 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 final para à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia. Área de Concentração: Biotecnologia. Linha de Pesquisa: Análises Integrativas de Sistemas Biológicos.

Orientadora: Profa. Dra. Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar

Coorientadora: Dra. Cleane Gomes Moreira

SOBRAL – CE

2020

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)

- M317e Marques, Francisca Valéria Bezerra Sampaio.
Efeito anti-inflamatório e neuroprotetor da fucoidana sozinha ou associada ao ácido valpróico no modelo de convulsão induzido por pilocarpina em camundongos / Francisca Valéria Bezerra Sampaio Marques. – 2020.
57 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Campus de Sobral, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Sobral, 2020.
Orientação: Profa. Dra. Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar .
Coorientação: Profa. Dra. Cleane Gomes Moreira .
1. Convulsão. 2. Fucoidana. 3. Anti-inflamatório. 4. Neuroproteção. I. Título.

CDD 660.6

FRANCISCA VALÉRIA BEZERRA SAMPAIO MARQUES

**EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO E NEUROPROTETOR DA FUCOIDANA
SOZINHA OU ASSOCIADA AO 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 final para à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia. Área de Concentração: Biotecnologia. Linha de Pesquisa: Análises Integrativas de Sistemas Biológicos.

Aprovada em: 28 / 01 / 2020.

BANCA EXAMINADORA

Profª. Dra. Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará -UFC

Dra. Cleane Gomes Moreira (Coorientadora)
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. Luiz Vieira da Silva Neto (Membro Interno)
Universidade Federal do Ceará - UFC

Profª. Dra. Maria Isabel Linhares (Membro Externo)
Centro Universitário Inta - UNINTA

Dedico este trabalho à Deus;

Aos meus pais, Maurício e Vilma, minha irmã Raquel, minha sobrinha Luna, meu esposo Félix e a toda minha família que, com muito amor, carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois sem a sua ajuda, a sua direção e o seu agir eu não teria capacidade para estar aqui, por se fazer presente em todos os momentos, por me ter dotado de saúde, sabedoria e disposição para alcançar mais uma vitória em minha vida.

Aos meus pais Maurício e Vilma, fonte de sabedoria, de paciência, guerreiros e protetores que se dedicaram sem medir esforços a minha formação, com muita humildade, dignidade e ensinando a confiar sempre em Deus. À minha irmã companheira, sincera, amiga, Raquel, que admiro tanto pelo seu jeito de ser e que nos presenteou com nossa princesa Luna.

Agradeço grandemente ao meu esposo Félix que está presente em todos os momentos, dando força, tendo paciência, dedicação, cuidando sempre do que sentimos um pelo outro, o nosso amor, mostrando sempre que somos capazes de tudo, se temos Deus nada, ninguém ou qualquer situação poderá tirar o brilho que temos.

Agradeço a minha Orientadora Lissiana que foi um anjo em minha vida. Sou grata a Deus por ter sido sua orientanda, serás exemplo sempre em minha vida, tanto como pessoa humana, quanto profissional. Desde já muita gratidão, muito carinho, muita admiração e muito respeito. Obrigada.

Agradeço a minha Coorientadora Cleane, pela amizade e dedicação ao nosso trabalho, mesmo com toda correria tirou um tempo para dar suporte, sendo fundamental para a conclusão dos resultados.

Meus agradecimentos a todos do laboratório da UFC (Laboratório de Fisiologia e Neurofarmacologia, Laboratório do Nubis, Laboratório de Biotecnologia Reprodutiva, Laboratório de Bioquímica, Laboratório de Microbiologia) e do Laboratório do UNINTA (Laboratório Nubem), companheiros de trabalhos e irmãos de amizade que fizeram parte de minha formação e contribuíram para o sucesso dos resultados.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, a equipe de professores que tive o prazer de conviver e participar como representante discente nas reuniões do colegiado, podendo assim contribuir de alguma forma ao programa Agradecer também a todos da Secretária, em especial Delane, por toda atenção e participação na minha caminhada como mestranda e, aos vigilantes por todo cuidado.

A Banca de Qualificação pela enorme contribuição e aos membros da Banca Examinadora aceitando o convite, se prontificando a participar desta fase final de dissertação. Desde já minha gratidão.

A equipe do Biotério por toda ajuda para a realização deste estudo e, claro, meu enorme respeito aos animais utilizados nos experimentos.

A Universidade Federal do Ceará e a agência de fomento CAPES, pelo apoio técnico e financeiro.

Por fim, agradeço aqueles que aqui não foram citados, mas, saibam que minha gratidão será eterna. Espero que de uma forma ou de outra, os resultados obtidos neste trabalho e na minha qualificação acadêmica, possam retornar à sociedade.

“Tudo posso naquele que me fortalece.”

(Filipenses 4:13)

RESUMO

A epilepsia é um distúrbio neurológico caracterizado por uma predisposição persistente do encéfalo de gerar e agravar crises convulsivas afetando cerca de 1% da população mundial. Dentre os mecanismos fisiopatológicos envolvidos no processo convulsivo, a neuroinflamação e o estresse oxidativo representam alvos farmacológicos para novas estratégias terapêuticas com efeitos modificadores da doença de relevância clínica. Atualmente, o polissacarídeo sulfatado de algas pardas (fucoidana), tem demonstrado diversas atividades biológicas, como antioxidante e antiinflamatória. Dessa forma, o presente estudo tem como objetivo avaliar o efeito antiinflamatório e neuroprotetor do polissacarídeo fucoidana sozinho ou associado ao ácido valpróico no modelo de convulsão induzida por pilocarpina em camundongos. Os animais (camundongos), Swiss, adultos, machos, (25-30g) receberam injeções de fucoidana (FUCO 7,5, 15 e 30 mg/kg, i.p.), ácido valpróico (AVP 100 e 400 mg/kg, i.p.), ácido valpróico + fucoidana (AVP100+FUCO7,5) ou solução salina - NaCl 0,9%, i.p. durante quatorze dias. Após 30 minutos da última injeção das drogas em estudo ou veículo, foi administrada metilescopolamina 1 mg/kg, i.p e, 30 minutos após, pilocarpina na dose de 400 mg/kg, i.p., em seguida, os animais foram submetidos aos testes comportamentais e sacrificados, sendo a área cerebral (hipocampo) dissecada para os ensaios neuroquímicas de determinação das concentrações de citocinas inflamatórias (TNF- α e IL-1 β) e determinação das alterações na expressão gênica (por qPCR) relacionada a neuroinflamação e fatores neurotróficos. O pré- tratamento com FUCO durante 14 dias aumentou a latência de morte dos animais, porém houve aumento da latência de convulsão apenas nas doses de 15 e 30 mg/kg. Na dose de AVP400 houve aumento tanto na latência de morte quanto na convulsão, porém não foi observado nenhum efeito significativo com o AVP na dose de 100 mg/kg. Entretanto, a associação FUCO+AVP reduziu a latência de convulsão em 62% e a latência de morte em 100% quando comparadas ao grupo PILO. A pilocarpina aumentou a concentração de IL-1 β e TNF α no hipocampo dos animais e esse efeito foi prevenido com o pré-tratamento com fucoidana em todas as doses, para o IL-1 β e apenas nas menores doses para o TNF α . A associação da FUCO+AVP promoveu diminuição em cerca de 69% e 55% na concentração de IL-1 β e TNF α , respectivamente. A pilocarpina aumentou a expressão do RNAm para BDNF, IL-1 β e TNF α . Nossos resultados sugerem que a fucoidana parece ser uma alternativa para o tratamento da epilepsia quando associado ao ácido valpróico, pois promove neuroproteção permitindo a redução da dose do AVP, mantendo os efeitos.

Palavras-chave: Convulsão. Fucoidana. Anti-inflamatório. Neuroproteção.

ABSTRACT

Epilepsy is a neurological disorder characterized by a persistent predisposition of the brain to generate and aggravate seizures affecting around 1% of the world population. Among the pathophysiological mechanisms involved in the convulsive process, neuroinflammation and oxidative stress represent pharmacological targets for new therapeutic strategies with disease-modifying effects of clinical relevance. Currently, the sulfated polysaccharide of brown algae (fucoidan), has demonstrated several biological activities, such as antioxidant and anti-inflammatory. Thus, this study aims to evaluate the anti-inflammatory and neuroprotective effect of fucoidan polysaccharide alone or associated with valproic acid in the pilocarpine induced seizure model in mice. The animals (adult male Swiss mice, 25- 30g) were treated with fucoidan (FUCO 7.5, 15 and 30 mg/kg, i.p.), valproic acid (VPA 100 and 400 mg/kg, i.p.), valproic acid + fucoidan (VPA100 + FUCO7.5) or saline (i.p.) for fourteen days. After 30 minutes of the last injection of the drugs or vehicle, methylscopolamine was administered 1 mg/kg, i.p. and, 30 minutes later, pilocarpine at a dose of 400 mg/kg, i.p. Animals were then submitted to behavioral tests and sacrificed, and the brain area (hippocampus) was dissected for neurochemical tests to determine concentrations of BDNF, inflammatory cytokines (TNF- α and IL-1 β) and to assess alterations in gene expression (by PCR) related to neuroinflammation and neurotrophic factors. Pre-treatment with FUCO for 14 days increased the animals death latency, but there was an increase in seizure latency only at doses of 15 and 30 mg / kg. In the AVP400 dose there was an increase in both death latency and seizure, but no significant effect was observed with AVP at a dose of 100 mg / kg. However, the association FUCO+AVP reduced the seizure latency by 62% and the death latency by 100% when compared to the PILO group. Pilocarpine increased the concentration of IL-1 β and TNF α in the animals hippocampus and this effect was prevented with the pre-treatment with fucoidan in all doses, for IL-1 β and only in the lower doses at TNF α . The association of FUCO+AVP promoted a decrease of about 69% and 55% in the concentration of IL-1 β and TNF α , respectively. Pilocarpine increased mRNA expression to BDNF, IL-1 β and TNF α . Our results suggest that fucoidan seems to be an alternative for the treatment of epilepsy when associated with valproic acid because it promotes neuroprotection allowing the reduction of the AVP dose while maintaining the effects.

Keywords: Convulsion. Fucoidan. Anti-inflammatory. Neuroprotection.

LISTA DE FIGURA

Figura 1 -	Estrutura da Fucoïdana.....	27
Figura 2 -	Protocolo Experimental.....	33
Figura 3 -	Continuação do Protocolo Experimental.....	34
Figura 4 -	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.....	39
Figura 5 -	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....	39
Figura 6 -	Efeito do Ácido Valpróico nas doses de 100 e 400 mg/kg sobre a latência de convulsão no teste de convulsão induzida por pilocarpina em camundongos.....	40
Figura 7 -	Efeito do Ácido Valpróico nas doses de 100 e 400 mg/kg sobre a latência de morte no teste de convulsão induzida por pilocarpina em camundongos..	41
Figura 8 -	Efeito da associação de ácido valpróico na dose de 100 mg/Kg e fucoïdana 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.....	42
Figura 9 -	Efeito da associação de ácido valpróico na dose de 100 mg/Kg e fucoïdana 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.....	42
Figura 10 -	Efeito do tratamento com FUCO sozinha e/ou em associação com AVP na quantificação do nível de IL-1 β e TNF- α em hipocampo de camundongos 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..	45
Figura 11 -	Eletroforese do RNA total isolado de hipocampo de camundongos.....	46
Figura 12 -	Análise do perfil de expressão do RNAm de IL-1 β e TNF- α em hipocampo.....	47
Figura 13 -	Análise do perfil de expressão do RNAm de BDNF em hipocampo.....	48

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Classificação da epilepsia segundo a sua etiologia.....	21
Tabela 2 - Propriedades biológicas da fucoïdana e alvos identificados.....	28
Tabela 3 - Comportamentos Observados.....	35
Tabela 4 - Primers utilizados para PCR em tempo real.....	37

LISTA DE QUADRO

Quadro 1 - Drogas e reagentes utilizadas durante a execução dos protocolos experimentais.....	31
Quadro 2 - Distribuição quantitativa dos animais por cada grupo experimental do protocolo.....	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AVP	Ácido valpróico
BDNF	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
cDNA	DNA complementar
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
COX	Cicloxigenase
DAE	Drogas antiepilépticas
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNase	Desoxirribonuclease
EEG	Eletroencefalograma
EPM	Erro padrão da média
FUCO	Fucoidana
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GDNF	Fator Neurotrófico Derivado da Glia
IL	Interleucina
ILAE	Liga Internacional contra Epilepsia
iNOX	Óxido Nítrico Sintase Induzível
LBE	Liga Brasileira de Epilepsia
LPS	Lipopolissacarídeo de <i>Escherichia coli</i>
MAGL	Monoacilglicerol lipase
MF	Feixe medial
MP	Metilescopolamina
MS	Ministério da Saúde
NGF	Fator de Crescimento de Nervo
NMDA	N-metil D-aspartato
NO	Óxido nítrico
NT	Neurotrofina
PCDT	Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas
PG	Prostaglandina

PILO	Pilocarpina
qPCR	PCR em tempo real
RNA	Ácido Ribonucleico
RNA _m	RNA mensageiro
RNA _t	RNA total
SE	Status Epilépticos
SNC	Sistema Nervoso Central
TGF- β	Fator de Crescimento Transformador
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TrKB	Tropomiosina Quinase B

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	20
2.1	Epilepsia.....	21
2.2	Drogas Antiepilépticas.....	22
2.3	Epilepsia e Inflamação.....	24
2.4	Epilepsia e Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF).....	25
2.5	Polissacarídeo Sulfatato de Alga Parda.....	27
3	OBJETIVOS.....	30
3.1	Objetivo Geral.....	30
3.2	Objetivos Específicos.....	30
4	METODOLOGIA.....	31
4.1	Animais.....	31
4.2	Aspectos Éticos.....	31
4.3	Obtenção e Preparo das drogas.....	31
4.4	Protocolo Experimental.....	32
4.5	Parâmetros Comportamentais.....	34
4.6	Quantificação dos níveis de citocinas inflamatórias (TNF-α e IL-1)	35
4.7	Extração de RNA total, Síntese de cDNA e Análise da Expressão Relativa por qPCR.....	35
4.7.1	Extração do RNA total.....	35
4.7.2	Análise Quantitativa e Qualitativa do RNA total.....	36
4.7.3	Síntese de cDNA.....	36
4.7.4	PCR quantitativa em tempo real (qPCR).....	36
4.8	Análise Estatística.....	37
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	38
5.1	Estudo Comportamental.....	38
5.1.1	Teste da Convulsão Induzida por Pilocarpina em camundongos tratados ou não com Fucoídano (FUCO) nas doses de 7,5, 15 e 30mg/Kg.....	38
5.1.2	Teste da Convulsão Induzida por Pilocarpina em camundongos tratados ou não com ácido valpróico (AVP) nas doses de 100 e 400 mg/Kg.....	40

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)	41
5.2	Quantificação dos níveis de citocinas pró-inflamatórias (TNF-α e IL-1), determinação da expressão do RNAm de mediadores neuroinflamatórios e fator neurotrófico (BDNF) através de PCR quantitativa em tempo real (qPCR) no tratamento com fucoïdana e/ou ácido valpróico no modelo de convulsão induzida por pilocarpine.....	44
6	CONCLUSÃO.....	50
	REFERÊNCIAS.....	51
	ANEXO – PARECER DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO ANIMAL (CEUA).....	57

1 INTRODUÇÃO

A epilepsia é considerada uma das condições cerebrais mais comuns, afetando mais de 70 milhões de pessoas em todo o mundo. É caracterizada por uma predisposição duradoura para gerar ataques epiléticos espontâneos e tem inúmeras consequências neurobiológicas, cognitivas e psicossociais (THIJS *et al.*, 2019). O paciente tem suas atividades diárias bastante limitadas, dificuldades para conseguir trabalho, e, muitas vezes, dependente da família e de amigos para cuidados, além da baixa autoestima e o medo de julgamentos da sociedade em geral (JAFARPOUR *et al.*, 2018)

Estima-se que a população geral com epilepsia ativa (convulsões contínuas ou com a necessidade de tratamento) possui uma proporção entre 4 e 10 por 1000 pessoas, podendo atingir valores entre 7 e 14 por mil pessoas em países de baixa e média renda, compreendendo cerca de 80% das pessoas com epilepsia. No Brasil, estima-se que a epilepsia atinja de 2% a 4% da população, acometendo pessoas em diferentes idades e classes sociais (WHO, 2019).

Um grande número de doenças ou lesões cerebrais pode causar epilepsia, e as mais frequentes são: anomalia cerebral durante o desenvolvimento, traumatismo craniano, hemorragias, anóxia durante o parto, tumores, infecção cerebral, crises prolongadas e crises febris (GAO *et al.*, 2017).

Existem mais de 25 diferentes drogas antiepiléticas (DAE's) utilizados na prática clínica no tratamento de pacientes com epilepsia. No entanto, apenas aproximadamente metade dos pacientes com epilepsia recentemente diagnosticada são tratadas com sucesso com o primeiro DAE prescrito e cerca de um terço dos pacientes com epilepsia sofre de crises intratáveis (CHEN *et al.*, 2018).

Pesquisadores buscam descobrir drogas que sejam capazes de diminuir as frequências e propagação das manifestações epiléticas. Muitas drogas já foram descobertas com essa finalidade, mas 30% dos pacientes não apresentam boa resposta ou apresentam efeito adverso severo às drogas disponíveis (VAZQUEZ *et al.*, 2014).

Por exemplo, o ácido valpróico (AVP) é uma droga antiepilética de primeira geração, de grande espectro e amplamente utilizado, mas que possui diversos efeitos colaterais relacionados a dose e ao tempo de tratamento (VAZQUEZ *et al.*, 2014). Assim, o estudo de drogas com potencial anticonvulsivante e que possua baixa toxicidade e efeito neuroprotetor que possa ser utilizada como adjuvante, associado ao anticonvulsivante convencional em dose mais baixa com manutenção do efeito terapêutico, pode contribuir de maneira satisfatória para o tratamento da epilepsia.

Nos últimos anos, a investigação de diversos metabólitos (polissacarídeos, lectinas, lipídeos, carotenoides, peptídeos, aminoácidos e outras moléculas) oriundos de macroalgas marinhas tem despertado elevado interesse, visto serem estes organismos detentores de amplo potencial para a bioprospecção de novas substâncias biologicamente ativas como biopolímeros e compostos essenciais para a nutrição humana (CHOLLET *et al.*, 2016).

Contudo, uma das características promissoras para a utilização biotecnológica das algas marinhas, além de seus pigmentos e morfologia, diz respeito à grande quantidade e diversidade estrutural de seus polissacarídeos. Dentre eles, o polissacarídeo fucoídano tem se tornado um excelente candidato a medicamentos para aplicações farmacêuticas (BARBOSA *et al.*, 2019).

O interesse da comunidade científica pelo polissacarídeo fucoídano e suas frações de baixo peso molecular (abaixo de 30 kDa) é impulsionada pelas suas vantagens de baixa toxicidade, biodisponibilidade oral (HSU; HWANG, 2019) e principalmente por seus benefícios à saúde, sendo relatadas amplas atividades biológicas, como efeitos anticâncer, antioxidante, anticoagulante, anti-inflamatório e imunomodulador (CHOLLET *et al.*, 2016).

No que tange as atividades biológicas desse polissacarídeo, foi verificado que a fucoídano exerce um efeito bifuncional, atuando como promotor e inibidor de reações biológicas, incluindo aquelas ligadas a processos inflamatórios (CHEN *et al.* 2018; USTYUZHANINA *et al.* 2014). Wen e colaboradores (2016) utilizando uma linhagem de macrófagos de camundongos (RAW 264.7) ativada com lipopolissacarídeo, verificaram uma inibição significativa da secreção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, TNF α), bem como uma diminuição da expressão do mRNA da IL-1 β , iNOS e ciclooxigenase 2 (COX-2) após a adição do polissacarídeo.

Recentemente, o estudo de Takahashi *et al.* (2018) revelou que os níveis de várias citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6 e TNF α , foram significativamente reduzidos após um curto período de administração de fucoídano em pacientes com câncer. Curiosamente, uma análise de subgrupo mostrou que a capacidade de resposta da IL-1 β estava significativamente correlacionada com a taxa de sobrevivência global dos pacientes com câncer.

Contudo, dentre as diversas atividades biológicas do polissacarídeo fucoídano, destaca-se em nosso grupo de pesquisa uma possível neuroproteção da fucoídano no modelo de convulsão induzido por pilocarpina, devido a redução do estresse oxidativo observado no trabalho de Araújo (2016) com sua associação a uma subdose do AVP. Além disso, a epilepsia tem sido alvo de estudo devido sua importância clínica justificada pela alta incidência, gravidade e, principalmente, refratariedade ao tratamento medicamentoso.

Portanto, a partir de estudos sobre as atividades biológicas da fucoidana, hipotetizamos que esse polissacarídeo em associação com a terapêutica convencional, poderia aliviar condições inflamatórias, exercer ação neuroprotetora, e apresentar efeitos benéficos no tratamento das convulsões, possibilitando a melhora da qualidade de vida de pacientes com epilepsia. Dessa forma, o presente estudo tem como objetivo avaliar o efeito anti-inflamatório e neuroprotetor do polissacarídeo fucoidana sozinho ou associado ao ácido valpróico no modelo de convulsão induzida por pilocarpina em camundongos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Epilepsia

A epilepsia é uma doença crônica do encéfalo caracterizada por descargas elétricas súbitas, anormais e desordenadas dos neurônios que causam convulsões ou crise epilética (FISHER; BONNER, 2018). A palavra “epilepsia” provém do grego e significa ser tomado, apreendido ou atacado. As crises podem surgir a qualquer momento ao longo da vida, podendo ocorrer esporádica ou frequentemente, porém, a incidência de epilepsia apresenta uma distribuição bimodal com aumento do risco de desenvolvimento em crianças e idosos (KOUTROUMANIDIS *et al.*, 2017; THIJS *et al.*, 2019).

A crise convulsiva é a manifestação clínica mais conhecida e é identificada como "ataque epilético". Nesse tipo de crise a pessoa pode cair ao chão, apresentar contrações musculares em todo o corpo, mordedura da língua, salivação intensa, respiração ofegante e, às vezes, até urinar (BRASIL, 2018). É uma condição que pode ter consequências em longo prazo, incluindo morte ou lesão neuronal e alteração de redes neuronais, dependendo do tipo e duração das crises. Pode ser classificada de acordo com sua semiologia (presença ou ausência de sinais, sintomas motores proeminentes e do grau de comprometimento da consciência), etiologia, registro do eletroencefalograma e idade do paciente (GOMES *et al.*, 2018).

Dentre as propostas de classificação das crises epiléticas, aquela que foi considerada, até o ano de 2017, como a proposta oficial da Liga Internacional Contra Epilepsia (ILAE), foi a Classificação das Crises Epiléticas formulada em 1981 (DREIFUSS *et al.*, 1981), baseada nas manifestações clínicas e nos achados do eletroencefalograma (EEG).

Depois de 35 anos da classificação de 1981, a ILAE aprovou um novo sistema de classificação de crises epiléticas (FISHER *et al.*, 2017). Uma das principais mudanças foi que a crise epilética anteriormente conhecida como “parcial simples” passou a ser designada como crise epilética “focal perceptiva” e a “parcial complexa” é chamada de crise epilética “focal disceptiva”. Oficialmente, a Liga Brasileira de Epilepsia (LBE) revisou a forma de traduzir os termos da classificação de 2017 e utilizou os termos perceptiva e disceptiva, mesmo assumindo sua inexistência no Português. Assumiram estes neologismos ao traduzirem os mesmos termos “perceptive and disceptive” do Inglês (YACUBIAN *et al.*, 2017-a e 2017-b).

Conforme Ferruzzi (2018), as mudanças que se destacaram nessa nova classificação foram enumeradas em sete destaques, em sua publicação, como sendo: 1) ‘Percepção’ foi usada

como classificador das crises focais; 2) Os termos ‘discognitivo’, ‘parcial simples’, ‘parcial complexa’, ‘psíquica’ e ‘secundariamente generalizadas’ foram eliminados; 3) Novos tipos de crises focais incluem automatismos, parada comportamental, hipercinéticas, autonômicas, cognitivas e emocionais; 4) Crises atônicas, clônicas, espasmos epiléticos, mioclônicas e tônicas podem ser tanto de início focal quanto generalizado; 5) O termo ‘crises focais evoluindo para tônico-clônica bilateral’ substitui ‘crise secundariamente generalizada’; 6) Novos tipos de crise generalizada são: ausência com mioclonias palpebrais, ausência mioclônica, mioclono-atônica, mioclono-tônico-clônica; e 7) Crises de início desconhecido podem ter características que ainda assim permitem ser classificadas.

Segundo os autores, a nova classificação não representa uma mudança drástica na anterior, mas promove maior flexibilidade e transparência na nomeação dos tipos de crises (FISHER *et al.*, 2017).

Além das mudanças na classificação de crises epiléticas, a ILAE de 2017 fez atualizações na classificação das epilepsias de modo a refletir o atual conhecimento da epilepsia e seus mecanismos, subdividindo em seis causas etiológicas: estrutural, genética, infecciosa, metabólica e imunológica, bem como um grupo de etiologia desconhecida. Ressalta-se, portanto, que uma pessoa pode ser classificada em mais de uma categoria etiológica (SCHEFFER, 2017). A tabela 1 resume a nova classificação da etiologia da epilepsia da ILAE.

Tabela 1 – Classificação da epilepsia segundo a sua etiologia.

Tipo de Epilepsia	Causas
Estrutural	Lesão estrutural no cérebro que tem um risco significativamente elevado de gerar a epilepsia. Podem ser adquiridas como no caso de acidente vascular cerebral, traumatismo e infecção; ou genéticas como em muitas malformações do desenvolvimento cortical. Apesar de haver uma base genética para estas malformações, é o fator estrutural que determina a existência da epilepsia. Portanto, o substrato de uma lesão estrutural pode ter origem genética, adquirida ou ambas.
Genética	Aplica-se quando a epilepsia é o resultado direto de uma maturação genética conhecida ou presumida. Uma etiologia genética refere-se a mutações de ganho ou perda de função causadoras da epilepsia naquele indivíduo sendo herdada ou não.
Infecciosa	Surge após uma infecção, como é o caso da encefalite vital que é causadora de crises após a fase aguda da infecção. Assim, refere-se a um indivíduo com epilepsia e não a um indivíduo que tem crises sintomáticas agudas na fase aguda de uma infecção.

Metabólica	Refere-se ao resultado direto de um distúrbio conhecido ou presumido, em que as crises são o sintoma principal. As causas metabólicas referem-se a defeitos metabólicos bem definidos com manifestação clínicas ou alterações bioquímicas por todo o corpo como são a porfiria, a uremia, as aminoacidopatias ou as crises piridoxino-dependentes. Em muitos casos, os distúrbios metabólicos terão um defeito genético. é provável que a maioria das epilepsias metabólicas venha a ter uma base genética, mas algumas poderão ser adquiridas, tais como a deficiência de folato cerebral.
Imunológica	Quando existe evidência de inflamação do sistema nervoso central imunologicamente mediada. Exemplos incluem as encefalites antireceptor NMDA (N-metilD-aspartato) e anti-LGI155. Resulta diretamente de uma perturbação imunológica em que as crises são o sintoma principal.
Causa Desconhecida	Há muitos indivíduos com epilepsia cuja causa permanece desconhecida. Nesta categoria não é possível fazer um diagnóstico específico, para além da semiologia eletroclínica básica. A determinação da etiologia depende da extensão da avaliação possível em cada indivíduo. Isto difere nos vários níveis de cuidados de saúde e em diferentes países, como em países pobres em recursos.

Fonte: SCHEFFER, 2017.

2.2 Drogas Antiepilépticas

A epilepsia causa um grande impacto negativo na vida dos pacientes e daqueles ao seu redor, afetando tanto o bem-estar físico quanto o psicológico. Estudos apontam que comorbidades como depressão, ansiedade, psicose e dificuldades de memória e linguagem são comuns em pacientes com epilepsia, sendo ainda mais comuns em portadores de epilepsia refratária. Há também uma ocorrência aumentada de distúrbios comportamentais entre os pacientes com epilepsia, principalmente entre aqueles que apresentam fatores de risco como dano cerebral, uso de drogas, influência ambiental negativa e baixa capacidade cognitiva (CONITEC, 2019).

Portanto, o tratamento da epilepsia tem por objetivo propiciar uma melhor qualidade de vida para o paciente, pelo alcance do controle das crises, com um mínimo de efeitos adversos e a principal forma de terapia adotada é o tratamento farmacológico com as Drogas Antiepilépticas, conhecidas como DAE (YACUBIAN, 2017).

Uma droga antiepiléptica pode ser definida como uma substância que quando administrada por um determinado período, pode diminuir a incidência ou severidade das crises epiléticas que acometem pacientes portadores de síndrome epiléticas. A primeira droga utilizada como antiepiléptica eficaz foi o sal de brometo de potássio, introduzido por Locock

(1857). Baseado numa premissa totalmente errada de que os pacientes com epilepsia tinham hipersexualidade, o autor usou esse sal e relatou resposta positiva em 14 de 15 mulheres com epilepsia catamenial (GUERREIRO, 2006). Desde então, inúmeros medicamentos foram introduzidos na prática clínica para o tratamento dos mais diversos tipos de epilepsia, uma doença crônica comum que atinge homens e mulheres em todas as faixas.

O Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas (PCDT) do Ministério da Saúde (MS) ressalta que a seleção do fármaco deve levar em consideração a eficácia clínica na prevenção de crises do tipo específico de epilepsia, efeitos adversos, tolerabilidade individual para alguns grupos de pacientes (crianças, mulheres em idade reprodutiva, gestantes e idosos) e facilidade de administração (CONITEC, 2019).

Existem várias drogas antiepiléticas disponíveis para o tratamento da epilepsia, os de 1^a (ditos tradicionais), 2^a (ditos recentes) e 3^a (ditos novos) linhas têm eficácia equivalente, porém o perfil de efeitos adversos e de interações medicamentosas costuma ser mais favorável aos fármacos antiepiléticos mais recentes. Por outro lado, por serem recentes, não se conhecem os eventuais efeitos adversos do uso destes fármacos por 20 a 30 anos. (CONITEC, 2019).

Entre as drogas antiepiléticas, destaca-se o ácido valpróico (AVP), um dos mais utilizados, com eficácia estabelecida para múltiplos tipos de crises. Após mais de um século da sua descoberta, ainda representa uma das DAE's mais eficazes. Os efeitos pré e pós-sinápticos do AVP dependem de uma ampla gama de ações, incluindo a regulação de correntes iônicas e a facilitação da transmissão GABAérgica e inibição glutamatérgica. Como resultado, o AVP modula indiretamente a liberação dos neurotransmissores e aumentando o limiar para a atividade convulsiva. Além, disso, foi relatado que o AVP exerce efeitos anti-epileptogênicos com modulação da neurogênese. Os mecanismos epigenéticos, incluindo as deacetilases histônicas (HDACs) e a modulação do Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF) e Fator Neurotrófico derivado da Glia (GDNF) são fundamentais para um possível efeito neuroprotetor. (ROMOLI *et al.*, 2019).

Embora o AVP seja geralmente bem tolerado e tenha um perfil de tolerabilidade favorável, o seu uso pode ser limitado pela redução da eficácia ou pelo aparecimento de reações adversas, que incluem hepatotoxicidade, distúrbios gastrointestinais, neurológicos, hematológicos, reações cutâneas, teratogenicidade e alterações metabólicas. Em sua maioria relacionadas a dose e ao tempo de uso (TOMSON; BATTINO; PERUCCA, 2016).

Além dos efeitos adversos, que estão presentes e são fatores limitantes da terapêutica com drogas antiepiléticas, a possibilidade de interações medicamentosas em casos de politerapia é problema que deve ser considerado e constitui um grande desafio no manejo dos

pacientes epiléticos. Outro problema relacionado ao tratamento farmacológico da epilepsia são os casos resistentes às drogas antiepiléticas, que correspondem a cerca de 30% dos pacientes (THIJS *et al.*, 2019).

A utilização de DAEs oferece o tratamento apenas sintomático da epilepsia, promovendo a redução da frequência das crises epiléticas recorrentes. A elevada refratariedade encontrada na farmacoterapia, restringe as alternativas terapêuticas. O tratamento cirúrgico empregado nos casos refratários à farmacoterapia é limitado devido à localização das áreas de epileptogênese e do risco de perda de funções cerebrais. As restrições metodológicas presentes no tratamento da epilepsia revelam a necessidade da busca por novas alternativas terapêuticas (YACUBIAN, 2017; THILS *et al.*, 2019).

Para estudar as convulsões e a epilepsia, são comumente utilizados modelos experimentais animais, dentre eles o modelo de convulsão induzido por pilocarpina, um potente agonista muscarínico, que é comumente usado para investigar propriedades de potenciais drogas antiepiléticas e os mecanismos da epileptogênese. A administração intraperitoneal aguda de PILO 400 mg / kg induz mudanças comportamentais, como automatismos olfativos e gustativos e convulsões límbicas motoras. As primeiras alterações eletrográficas observadas são restritas ao hipocampo e depois a atividade epileptiforme se propaga para outras estruturas límbicas, como amígdala e, finalmente, para o córtex. Portanto, considera-se que em modelo de convulsão aguda o hipocampo seria a área cerebral principal (CARVALHO *et al.*, 2019).

Entender a fisiopatologia da epilepsia é fundamental para a descoberta de novos agentes terapêuticos que possam prevenir ou reverter os mecanismos lesivos e melhorar o tratamento dos pacientes. A epileptogênese tem sido intensamente investigada, resultando na identificação de várias modificações moleculares e celulares que ocorrem no cérebro após lesões cerebrais agudas em modelos animais de epilepsia adquirida. Um dos mecanismos mais comumente implicados é a neuroinflamação (TERRONE *et al.*, 2019).

2.3 Epilepsia e a Inflamação

A inflamação ocorre como uma resposta imunológica ao dano celular induzido por estímulo nocivo (agentes químicos, físicos ou biológicos). Trata-se de um processo adaptativo essencial para o reparo e manutenção de estruturas teciduais (LUGRIN *et al.*, 2014). Na fase aguda da inflamação, proteínas do plasma e leucócitos saem rapidamente dos vasos sanguíneos para os sítios de lesão dando início a uma série de acontecimentos bioquímicos e celulares, envolvendo o sistema imunológico, vascular e células locais (DEY *et al.*, 2016).

Como um componente crucial da imunidade inata, a inflamação aguda funciona como uma tentativa de diminuir os estímulos prejudiciais e dar início ao processo de cicatrização. Contudo, trata-se de um processo que pode evoluir para um quadro crônico e a ativação de modo exagerado ou inadequado do processo inflamatório pode provocar alterações expressivas nas funções dos tecidos, comprometendo gravemente o equilíbrio (LUGRIN *et al.*, 2014).

No Sistema Nervoso Central (SNC), essa atividade imuno-inflamatória está também relacionada com os mecanismos fisiopatológicos de doenças neurodegenerativas, abrangendo também a epilepsia. Os mediadores inflamatórios exercem funções importantes incluindo desde perturbações na integridade da barreira hematoencefálica, até ativação da via de sinalização das ciclooxigenases (COX) e prostaglandinas, além da liberação de citocinas pró e anti-inflamatórias (HO *et al.*, 2015).

Crescentes evidências sugerem que o processo inflamatório envolvido na fisiopatologia da epilepsia pode desempenhar um papel importante na ictogênese (mecanismos de geração das crises em pacientes com epilepsia) e na epileptogênese (processo envolvido no desenvolvimento da epilepsia secundária a uma lesão cerebral). Essa contribuição deletéria da inflamação tem sido bem estabelecida para uma variedade de distúrbios neurológicos, como na Doença de Alzheimer (GAO *et al.*, 2017).

Modelos animais de epileptogênese, em particular ratos ou camundongos, utilizando estimulação elétrica ou por quimioconvulsivantes, apresentaram uma resposta neuroinflamatória comum em áreas do cérebro afetadas pela lesão primária. Esta resposta de início rápido (em minutos) envolve a liberação de moléculas inflamatórias geradas por células gliais ativadas, neurônios e componentes celulares da barreira hematoencefálica, como pericitos, glia e células endoteliais (CHENG *et al.*, 2018; VAN VLIET *et al.*, 2018; KLEMENT *et al.*, 2019).

Entre a vasta gama de mediadores inflamatórios que contribuem para a complexidade da neuroinflamação, atenção especial tem sido dedicada às citocinas como a Interleucina (IL)-1 β , o Fator de Necrose Tumoral (TNF), o Fator de Crescimento Transformador (TGF)- β , a cascata prostanóide envolvendo a monoacilglicerol lipase (MAGL) e a cascata da ciclooxigenase (COX)-2 com geração de prostaglandina E2. Esses sinais moleculares são gerados principalmente em células gliais e neurônios, e persistem após o evento convulsivo (TERRONE *et al.*, 2018 ; TERRONE *et al.*, 2019, VAN VLIET *et al.*, 2018, GAO *et al.*, 2017; HO *et al.*, 2015).

Os efeitos terapêuticos obtidos pela interferência da neuroinflamação na epilepsia experimental reduzem significativamente a geração e recorrência de convulsões. As evidências

moleculares e farmacológicas emergentes apoiam que os mecanismos de resolução da neuroinflamação mediada por moléculas antiinflamatórias são benéficas na epilepsia, o que provavelmente contribui para reduzir as consequências de uma neuroinflamação demasiado extensa ou persistente (TERRONE *et al.*, 2019).

2.4 Epilepsia e Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF)

O fator Neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), o fator de crescimento de nervo (NGF), neurotrofina-3 (NT-3) e neurotrofina-4 (NT-4) pertencem à família das neurotrofinas, peptídeos que regulam o crescimento e a sobrevivência dos neurônios, que são expressas significativamente na formação hipocampal, e estão envolvidas em processos relacionados à aprendizagem e memória (BOHLEN, 2018).

O BDNF é a neurotrofina mais abundante e se liga especificamente ao receptor de tropomiosina quinase B (TrkB). O BDNF pode ser considerado um mediador molecular na função e estrutura da plasticidade sináptica, desempenhando um papel fundamental na formação e consolidação da memória. Assim, alterações no transporte ou produção do BDNF pode resultar em sintomas clínicos de deterioração da memória e disfunção cognitiva (WURZELMANN; ROMEIKA; SUN, 2017).

Durante condições fisiológicas normais, a secreção de BDNF é atribuída aos neurônios, enquanto os astrócitos estão relacionados a seu armazenamento e secreção. Segundo Wurzelmann e colaboradores (2017), o BDNF pode ser um alvo terapêutico potencial em distúrbios cerebrais devido a seu papel fundamental na gênese neuronal, diferenciação e sobrevivência; viabilidade sináptica e plasticidade; aprimoramento na transmissão sináptica e potencialização a longo prazo.

Vários estudos recentes descreveram o papel marcante do BDNF na excitabilidade neuronal na epileptogênese em modelos animais e pacientes com epilepsia. Primeiro, após uma convulsão induzida, as proteínas BDNF e TrkB endógenas parecem estar positivamente reguladas nas áreas cerebrais que são conhecidas por representar o substrato anatômico da epilepsia (hipocampo e córtex entorrinal). Além disso, níveis aumentados de proteína BDNF e TrkB nas culturas de hipocampo também são observadas em modelos de hiperexcitabilidade neuronal pós-traumática, apontando assim o importante papel da sinalização de BDNF / TrkB na hiperexcitabilidade e plasticidade pós-traumática (IUGHETTI, 2018).

É importante ressaltar que a supregulação dos mRNA do BDNF no hipocampo induzida por convulsões ou talvez por outros estímulos, como traumatismos cerebrais ou

hipoxia, leva ao aumento da produção de BDNF pelas células granulares do giro denteado, aumento do transporte e da liberação de BDNF pelos axônios do feixe medial (MF) do prosencéfalo, resultando na ativação dos receptores TrkB em regiões do stratum lucidum de CA3 e hilo. Isto sugere que o reforço do input excitatório do MF em células piramidais CA3 pode ser um mecanismo primário pelo qual BDNF promove a epileptogênese. Em convulsões agudas, o BDNF provavelmente participa dos mecanismos lesivos devido as suas rápidas ações modulando as sinapses excitatórias e inibitórias. (IUGHETTI, 2018).

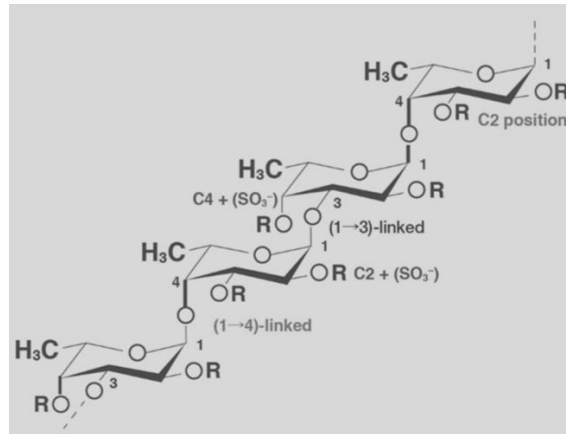
Devido aos possíveis efeitos "pró-convulsivantes" do BDNF, os mecanismos moleculares que regulam a síntese do BDNF e a sinalização TrkB podem ser potenciais alvos para o desenvolvimento de drogas anticonvulsivantes e anti-epileptogênicas (LIN *et al.*, 2019).

2.5 Polissacarídeo extraído de algas pardas

As algas marinhas são os principais produtores de todos os ecossistemas aquáticos e servem como fontes importantes de substâncias naturais bioativas. Existem cerca de 9000 espécies de macroalgas e são classificadas de acordo com seus pigmentos: Phaeophyta (algas marrons), Rhodophyta (algas vermelhas) e Chlorophyta (algas verdes). As macroalgas são uma rica fonte de polissacarídeos, minerais, vitaminas e substâncias bioativas usadas no desenvolvimento de novos agentes farmacêuticos. Um dos polissacarídeos mais estudados das algas marinhas pardas é a fucoídiana (BARBOSA, 2016).

A fucoídiana foi isolada e descoberta pela primeira vez em 1913 pelo Dr. Kylin, da Universidade de Uppsala, Suécia, a partir de algas pardas: *Ascophyllum nodosum*, *Fucus vesiculosus*, *Laminaria digitata* e *Laminaria saccharina* (KYLIN, 1913). Estruturalmente, a fucoídiana possui uma composição química simples e é uma molécula do tipo heparina com um α -1,3 backbone ou uma unidade de repetição que consiste em dissacarídeos que contêm uma fucose ligada a 1,3 e uma fucose ligada a 1,4 com ramos ligados nas posições C2, como mostrado na Figura 1.

Figura 1 – Estrutura da Fucoidana



Fonte: HSU; HWANG, 2019.

Em geral, a fucoidana contém uma porcentagem substancial de l-fucose polimerizada com grupos éster sulfatados e uma pequena proporção de d-galactose, d-glicose, d-manose, d-xilose e resíduos de ácido glucurônico (CHOLLET et al, 2016), além de proteínas, cálcio, cobre, magnésio, manganês, potássio, selênio, sódio, zinco e outros minerais. Num amplo sentido químico, fucoidana refere-se a polissacarídeos compostos principalmente de fucose sulfatada (HSU; HWANG, 2019).

A fucoidana é um polissacarídeo marinho econômico abundante que exibe um amplo espectro de atividades biológicas com potenciais aplicações clínicas. Por mais de meio século, extensas obras foram publicadas sobre as atividades dessas moléculas (CHOLLET *et al.*, 2016) algumas das avaliações mais recentes estão listadas na Tabela 2.

Tabela 2. Propriedades biológicas da fucoidana e alvos identificados.

Propriedades Biológicas	Alvos Identificados	Referência
Anticoagulante / antitrombina	Antitrombina, cofator II da heparina	ZHAO <i>et al.</i> , 2016 ZAPOROZHETS; BESEDNOVA, 2016
Anti-complemento	C4, C4b, 2a, C3 e C3b, Bb	TISSOT; DANIEL, 2003 ZAPOROZHETS; BESEDNOVA, 2016
Anti-viral	CD4	WANG; WANG; GUAN, 2012 DINESH <i>et al.</i> , 2016
Anti-inflamatório	P-selectina e L-selectina	WU <i>et al.</i> , 2016 WEN <i>et al.</i> , 2016

Efeito angiogênico	VEGFs, bFGF, FGF-2// α 6, β 1 e subunidades de integrina PECAM-1	BOUVARD <i>et al.</i> , 2015 HADDAD <i>et al.</i> , 2015
Anti-câncer	Capsases-3, -8 e -9, MAPK e seus inibidores, HIF-1	KWAK, 2014 AKIHIRO <i>et al.</i> , 2015
Antidiabética	α -glucosidase, α -amilase	LIU <i>et al.</i> , 2016 WANG <i>et al.</i> , 2016
Potencializadora imunológica	Células NK, células T, células dendríticas	MYERS <i>et al.</i> , 2011 ISNANSETY; FIKRIYAH; KASANAHA, 2016
Antioxidante	–	MORONEY <i>et al.</i> , 2015 HIFNEY <i>et al.</i> , 2016

Fonte: HSU; HWANG, 2019.

Dentre as muitas atividades atribuídas a fucoidana, uma das mais promissoras é a antiinflamatória. Park e colaboradores (2011) estudaram o efeito antiinflamatório da fucoidana *in vitro* e verificaram que a fucoidana foi capaz de suprimir a expressão gênica de mediadores pró-inflamatórios induzidos por LPS e inibir a liberação de NO, PGE2, IL-1 β e TNF- α . Sugerindo que a fucoidana pode ser considerada um agente promissor para uso como um tratamento potencial para doenças inflamatórias e neurodegenerativas.

Estudos mais recentes têm demonstrado que a fucoidana diminui significativamente os níveis de IL-1 β na lesão cerebral de isquemia-reperfusão de forma dose-dependente (CHE; MA; XIN, 2017), melhora a lesão de isquemia-reperfusão hepática através da supressão da atividade da caspase-1 (LI *et al.*, 2017) e melhora significativamente as anormalidades comportamentais através da redução da superexpressão da caspase-1 no hipocampo de ratos submetidos ao modelo de depressão (LI *et al.*, 2020).

Além desses efeitos, foi sugerido que a fucoidana pode apresentar ação neuroprotetora relacionada a inibição da ativação das micróglia, redução dos níveis de TNF- α e da geração de espécies reativas de oxigênio em modelo de doença de Parkinson induzido por LPS em ratos (CUI *et al.*, 2012) e com a redução da ativação de células gliais (micróglia e astrócitos) envolvidas na neuroinflamação em modelo de isquemia cerebral (KIM *et al.*, 2019).

Os dados apresentados mostram que esse polissacarídeo de algas marrons possui ampla atividade farmacológica, podendo atuar como anti-inflamatório, antioxidante, neuroprotetor, mostrando-se promissor na construção de novos medicamentos com grande potencial terapêutico para o tratamento de doenças neurodegenerativas, entre elas, a epilepsia.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito anti-inflamatório e neuroprotetor do polissacarídeo fucoídano sozinha ou em associação com o ácido valpróico no modelo de convulsão induzida por pilocarpina em camundongos.

3.2 Objetivos específicos

- Analisar o efeito do tratamento com fucoídano sozinha ou em associação com o ácido valpróico sobre as alterações comportamentais na escala de Racine, latência de convulsão e morte de camundongos em modelo de convulsão induzida por pilocarpina.
- Determinar as concentrações de citocinas inflamatórias, TNF- α e IL-1 β no hipocampo dos animais pré-tratados com fucoídano sozinha ou em associação com o ácido valpróico e submetidos a convulsão com pilocarpina
- Determinar as alterações na expressão gênica por qPCR, relacionadas a neuroinflamação (TNF- α , IL-1 β) e fatores neurotróficos (BDNF), em hipocampo de animais pré-tratados com fucoídano sozinha ou em associação com o ácido valpróico e submetidos a convulsão com pilocarpina.

4. METODOLOGIA

4.1. Animais

Foram utilizados camundongos Swiss, machos, pesando entre 25-30 g provenientes do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC - Fortaleza. Os animais foram mantidos em suas casas gaiolas, com 6 animais, à temperatura média de $24 \pm 2^\circ\text{C}$ em ciclos de alternância claro/escuro de 12 horas, recebendo ração padrão (Nuvilab) e água ad libitum.

4.2. Aspectos Éticos

Foram seguidas as recomendações de manejo dos animais durante o estudo, objetivando reduzir o sofrimento e possíveis danos que estes vieram a sofrer. Os protocolos experimentais seguiram os princípios éticos na experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), sendo aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Ceará/*campus* Sobral, sob o número de protocolo 09/18 (ANEXO I).

4.3. Obtenção e Preparo das drogas

As drogas e reagentes utilizados para a realização dos experimentos estão descritos no Quadro 1.

Quadro 1 – Drogas e reagentes utilizadas durante a execução dos protocolos experimentais.

DROGA/REAGENTE	PREPARO
Ácido Valpróico – Valproato de Sódio (Biolab)	100 e 400 mg/kg, via intraperitoneal. Será dissolvida em solução salina.
Cloridrato de pilocarpina (Sigma Chemical Co, USA)	320 mg/kg, via intraperitoneal. Será dissolvida em solução salina.
Fucoidana de <i>Fucus vesiculosus</i> (Sigma Chemical Co, USA)	7,5, 15 e 30 mg/kg, via intraperitoneal. Será dissolvido em solução salina.

Metilescopolamina (Sigma Chemical Co, USA)	1 mg/kg, via intraperitoneal. Será dissolvido em solução salina.
---	--

Fonte: Próprio Autor

4.4. Protocolo Experimental

O protocolo experimental para a quantificação dos níveis de citocinas inflamatórias (TNF- α e IL-1), teve-se como referência o estudo de Araújo (2016), ou seja, foram utilizados 48 animais divididos aleatoriamente em 8 grupos experimentais, sendo estes: fucoidana (7,5, 15 e 30 mg/kg, i.p.), ácido valpróico (100 e 400 mg/kg, i.p.), ácido valpróico + fucoidana (AVP100+FUCO7,5), solução salina NaCl 0,9%, i.p. (a pilocarpina e as demais drogas foram dissolvidas em solução salina).

Para a determinação da expressão do RNAm de mediadores neuroinflamatórios através de PCR quantitativa em tempo real (qPCR), foi utilizada a melhor dose da quantificação dos níveis de citocinas inflamatórias (TNF- α e IL-1), como também, do trabalho de Araújo (2016), ou seja, a melhor dose de fucoidana sozinha e em associação com o ácido valpróico, totalizando 12 animais divididos aleatoriamente em 4 grupos experimentais, sendo estes: fucoidana (7,5 mg/kg, i.p.), ácido valpróico + fucoidana (AVP100+FUCO7,5), solução salina NaCl 0,9%, i.p., conforme Quadro 2.

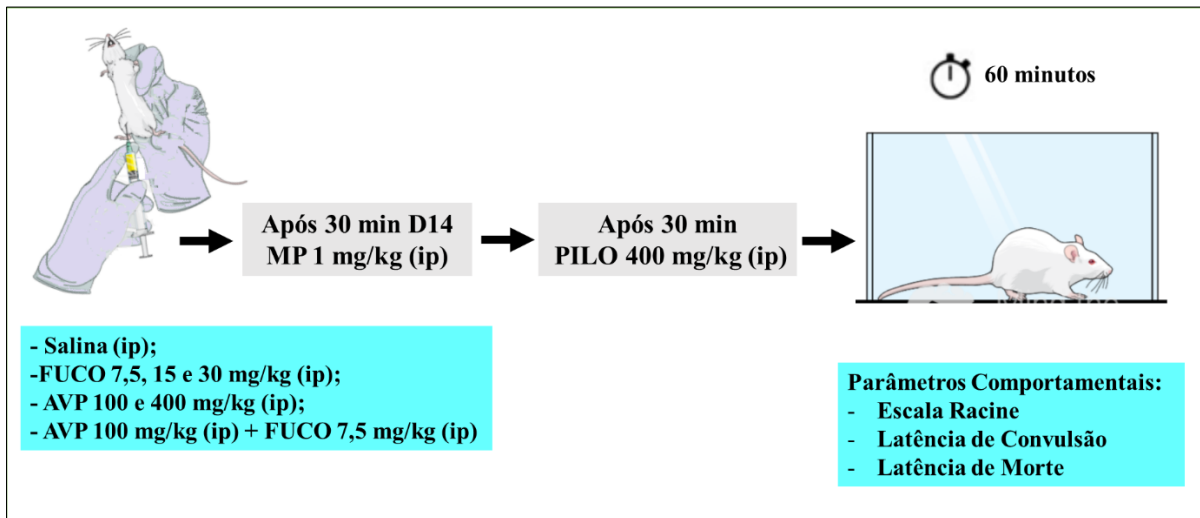
Quadro 2 – Distribuição quantitativa dos animais por cada grupo experimental do protocolo.

GRUPO	DOSAGENS	
	Citocina	qPCR
Solução salina - NaCl 0,9% + (P320)	6	3
Solução salina - NaCl 0,9%	6	3
FUCO (7,5 mg/kg, i.p.) + (P320)	6	3
FUCO (15 mg/kg, i.p.) + (P320)	6	-
FUCO (30 mg/kg, i.p.) + (P320)	6	-
AVP (100 mg/Kg, i.p.) + (P320)	6	-
AVP (400 mg/Kg, i.p.) + (P320)	6	-
AVP (100 mg/Kg, i.p.) + FUCO (7,5 mg/kg, i.p.) + (P320)	6	3
Total	48	12
Total Geral	60	

Fonte: Próprio Autor

Cada grupo foi tratado, por via intraperitoneal, durante 14 dias. Após esse período, no último dia passados 30 minutos do tratamento, os animais receberam metilescopolamina (1 mg/kg, i.p.) e, 30 minutos após, foram tratados com a pilocarpina 400 mg/kg, (P400), i.p, em seguida, foram observados por 1 hora para o teste comportamental. O controle negativo recebeu apenas salina (Sham), Figura 2.

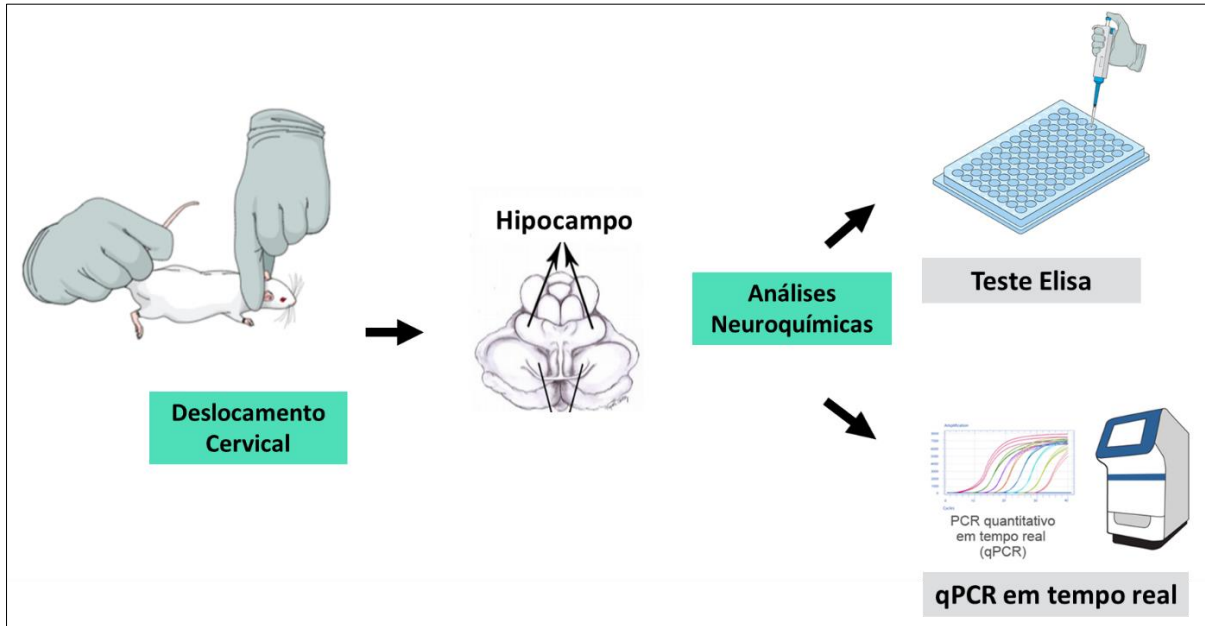
Figura 2. Protocolo Experimental.



Fonte: Próprio Autor. MP (Metiescopolamina), PILO (Pilocarpina).

Depois desse período de observação, os animais que sobreviveram ao teste comportamental foram eutanasiados por deslocamento cervical, e em seguida, juntamente com os animais que não sobreviveram ao comportamento, a área cerebral (hipocampo) foi dissecada. Todo o procedimento foi realizado na presença de gelo com a utilização de uma tesoura de microdissecação. Terminada a dissecação, a área foi colocada em papel alumínio, sobre gelo, pesada e armazenada a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para realização das análises neuroquímicas (Teste Elisa e qPCR em tempo real), Figura 3.

Figura 3. Continuação do Protocolo Experimental.



Fonte: Próprio Autor.

4.5. Parâmetros Comportamentais

Os animais tratados e controles foram divididos em gaiolas contendo 6 animais e colocados em ambiente reservado, sendo feita a observação direta. O critério para classificação do *status epilepticus* (SE) foi baseado na persistência de crises contínuas. No período de indução do SE, as alterações comportamentais decorrentes das crises epiléticas foram observadas, tais como: a presença de sinais colinérgicos periféricos, convulsões motoras, instalação de estado epilético, número de mortes, latência de convulsão e latência de morte em cada grupo e classificadas de acordo com o Tabela 3.

Tabela 3. Comportamentos observados.

Observação	Escore	Comportamento
Sem Convulsão	0	Normal (Imobilidade)
Convulsão Límbica	1	Automatismo Faciais
	2	Mioclonias de cabeça e pescoço
	3	Clonias de patas anteriores
Convulsão Motora	4	Clonias de patas posteriores rearing e salivação
	5	Elevação e queda – <i>status epilepticus</i>
	Latência da 1ª Convulsão
Outras observações	Latência de Morte

Fonte: Adaptado de Racine (1972)

4.6. Quantificação dos níveis de citocinas inflamatórias (TNF- α e IL-1)

Os níveis de citocinas inflamatórias (TNF- α e IL-1) foram analisadas por meio de técnicas imunoenzimáticas (ELISA), através da utilização de kits (R & D Systems), seguindo as instruções dos fabricantes.

4.7. Extração de RNA total, Síntese de cDNA e Análise da Expressão Relativa por qPCR

4.7.1 Extração do RNA total

O RNA total foi extraído do hipocampo dos camundongos utilizando TRIzol[®] (Life Technologies/Invitrogen), seguindo as orientações do fabricante baseado no método de isolamento de RNA num único passo desenvolvido por Chomczynski e Sacchi (1987). Para isso, a referida área cerebral foi colocada em homogeneizador manual na presença de 1 mL do reagente TRIzol[®]. Posteriormente o RNA total foi purificado pelo método guanidino-isotiocianato-fenol-clorofórmio e, após posterior precipitação com uso de isopropanol (isopropanol ou 2-propanol) e etanol 75% (diluído com água tratada com DEPC), o RNA total foi mantido (-80°C) em água ultra pura tratada com DEPC).

Em seguida, o RNA total foi tratado com DNase. Foi utilizada a enzima DNase I, Amp Grade (Invitrogen[™]), seguindo instruções do fabricante. Para cada reação foi utilizado 1µg de RNA total, 1µl de 10X DNase I Reaction Buffer, 1 µl DNase I (Amp Grade, 1 U/µl) e água tratada com DEPC q.s.p. 10 µl. Após, a mistura foi incubada por 15 min em temperatura

ambiente. A inativação da DNase ocorreu pela adição de 1 µl de solução de 25 mM EDTA e incubado por 10 min a 65°C.

4.7.2 Análise Quantitativa e Qualitativa do RNA total

Para testar a eficácia da extração e pureza do RNA total, foi determinada a concentração de RNA total nas amostras por diluição do RNA (fator de diluição 1:50), em espectrofotômetro no comprimento de onda de 260nm (A_{260}) e 260/280 nm (A_{260}/A_{280}). A qualidade do RNA total foi verificada por eletroforese em gel agarose 1%, corado com brometo de etídio (10 mg/mL) e visualizado em um equipamento de luz ultravioleta.

4.7.3 Síntese de cDNA

Para a síntese de cDNA (DNA complementar) foi utilizado o kit High-Capacity RNA-to-cDNA™ Kit (Applied Biosystems) e a reação foi realizada seguindo instruções do fabricante. Foi utilizado por reação 10µL do 2X RT Buffer Mix (dNTPs, octâmeros randômicos, e oligo dT-16), 1µL do 20X RT Enzyme Mix (MuLV e inibidor de RNase), até 2µg de RNA total, e água livre de RNase (tratada com DEPC) q.s.p. 20 µL. Após, a mistura foi incubada em termociclador a 37 °C por 60 min, sendo posteriormente aquecido a 95 °C por 5 min e em seguida armazenada a -20 °C.

4.7.4 PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

As análises quantitativas da expressão dos genes (TNF- α , IL-1beta e BDNF) foram realizadas através de PCR em Tempo Real (qPCR). Para tanto, 0,1 µg do cDNA de cada amostra foi utilizada na reação de qPCR. Além dos ácidos nucleicos, a reação foi composta de iniciadores específicos (300 nm cada) e 10 µL de 2X Power SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems), com volume final de 20 µL. A reação de amplificação foi realizada no termociclador Mastercycler® ep realplex4 (Eppendorf) consistindo de desnaturação inicial de 95 °C/10 min seguido de 40 ciclos térmicos de 94 °C por 30 s, temperatura de cada primer (Tabela 3) por 20 s e 72 °C por 20 s. Para análise de prováveis contaminantes foi realizada detecção da presença de produtos (amplicons) inespecíficos por análise da curva de Melting, constando de temperatura inicial de 95 °C/15 s, seguido por gradiente de 20 min e temperatura final de 95 °C/15 s. Para as análises da expressão dos genes, a amplificação das sequências

alvos foram detectadas em tempo real pela emissão de fluoróforos, a qual foi captada pela unidade óptica do aparelho.

Tabela 4. Primers utilizados para PCR em tempo real

Gene	Temperatura Anelamento	Sequência dos Primers	Referência
TNF- α	54°C	Forward: 5' TGCCTATGTCTCAGCCTCTTC 3' Reverse: 5' GAGGCCATTTGGGAACTTCT 3'	(GROSS <i>et al.</i> , 2017)
BDNF	58°C	Forward: 5' CGAAGAGCTGCTGGATGAG 3' Reverse: 5' ATGGGATTACACTTGGTCTCG 3'	(SUN <i>et al.</i> , 2019.a)
IL-1 β	58°C	Forward: 5' TCCAGGATGAGGACATGAGCAC 3' Reverse: 5' GAACGTCACACACCAGCAGGTTA 3'	(SUN <i>et al.</i> , 2019.b)
GAPDH	58°C	Forward: 5' AAATGGTGAAGGTCGGTGTGAAC 3' Reverse: 5' CAACAATCTCCACTTTGCCACTG 3'	(SUN <i>et al.</i> , 2019.b)

As análises dos dados de fluorescência obtidos foram realizadas pelo Realplex Software 2.2 ®. Todas as reações, tanto dos genes alvo quanto do controle endógeno, foram realizadas em triplicatas. Os Cycle threshold – Ct, utilizados para a normalização de dados e para as análises, foi a média aritmética entre as triplicatas dos genes alvo e controles endógenos. A obtenção da expressão relativa foi realizada pelo método descrito por Livak e Schmittgen (2001). Para a normalização, foi utilizada a equação $\Delta Ct = Ct$ (gene alvo) – Ct (controle endógeno), para a calibração determinada pela fórmula: $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ (amostra) – ΔCt (calibrador) e a quantificação relativa (valores arbitrários) obtida pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK *et al.*, 2001). Foi utilizado o grupo Salina como calibrador e a expressão do gene constitutivo GAPDH utilizada como controle endógeno para a normalização dos referidos dados.

4.8. 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 de Tukey (Latência de Convulsão, Latência de Morte e Teste Elisa) e pelo teste de Dunnett (qPCR), ambos, como teste post hoc. Quando $P < 0,05$, as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Estudo Comportamental

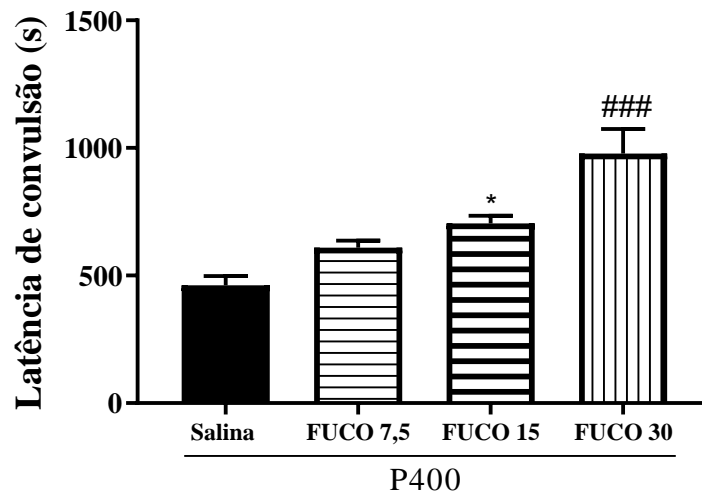
5.1.1 Teste da Convulsão Induzida por Pilocarpina em camundongos tratados ou não com Fucoïdana (FUCO) nas doses de 7,5, 15 e 30mg/Kg

Após a administração de pilocarpina, 400mg/Kg, i.p. (P400) os animais demonstraram 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 (80%).

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: $608 \pm 27,95$; FUCO15: $704,2 \pm 30,59$; FUCO30: $978,2 \pm 96,30$] quando comparado ao grupo da pilocarpina [P400: $462 \pm 36,56$]. Os melhores resultados foram observados nas doses de 15 e 30 mg/Kg, onde houve aumento da latência de convulsão, respectivamente, 50% e 100% (Figura 4).

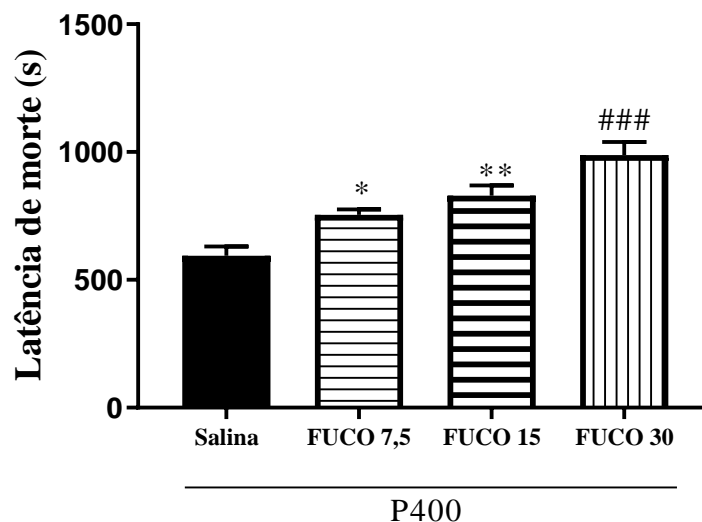
Por sua vez, houve um aumento também na latência de morte(s) nas doses de 7,5, 15 e 30 mg/Kg [FUCO7,5: $754,6 \pm 20,59$; FUCO15: $829,3 \pm 40,66$; FUCO30: $988,6 \pm 50,19$] comparado ao grupo da pilocarpina [P400: $594,6 \pm 36,43$]. Sendo que, teve redução em todas as doses observadas, ou seja, 7,5, 15 e 30 mg/Kg, com um percentual de 30%, 40% e 60%, respectivamente (Figura 5).

Figura 4. 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 60 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, com $n = 5$ a 6 animais. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido de pós-teste de Tukey. (* $p < 0,05$; ### $p < 0,0001$) vs Salina + P400.

Figura 5. 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.



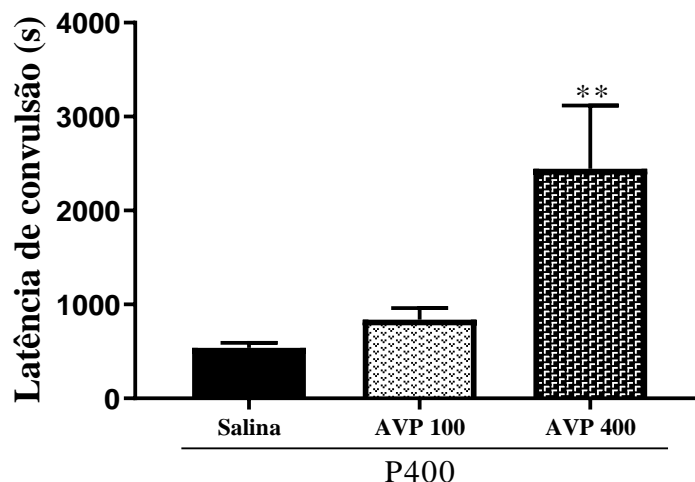
Grupos tratados com Fucoïdana nas doses (7,5, 15 e 30 mg/Kg; i.p.) durante 14 dias e após 60 minutos do tratamento no 14^a dia foi induzida a convulsão com P400 (400 mg/Kg; i.p.). Os valores representam a média \pm EPM da latência de morte, com $n = 5$ a 6 animais. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido de pós-teste de Tukey. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; ### $p < 0,0001$) vs Salina + P400.

5.1.2 Teste da Convulsão Induzida por Pilocarpina em camundongos tratados ou não com ácido valpróico (AVP) nas doses de 100 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: $839,5 \pm 121,6$; AVP400: $2444 \pm 673,0$]. A dose de 100 mg/Kg foi utilizada neste trabalho como uma subdose, por não ter mostrado diferença significativa do grupo da pilocarpina [P400: $537,9 \pm 55,09$]. (Figura 6).

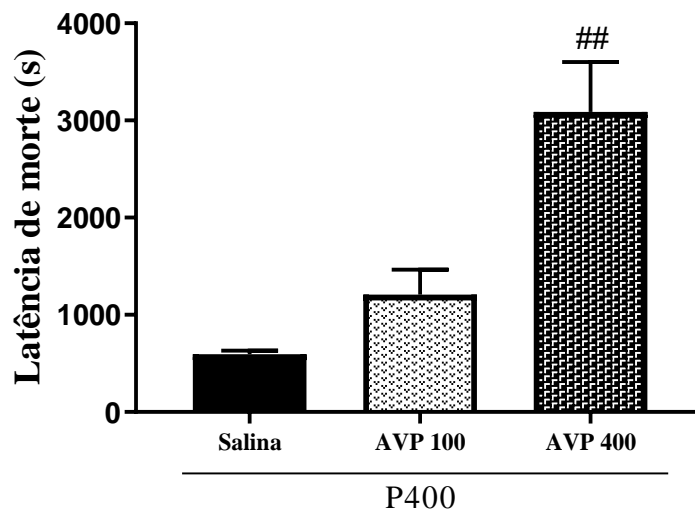
Foi verificado na dose de 400 mg/kg um aumento de quase 3 vezes a latência de morte [AVP100: $839,5 \pm 121,6$; AVP400: $2444 \pm 673,0$] quando comparado com o grupo da pilocarpina [P400: $537,9 \pm 55,09$]. No grupo da dose de 400 mg/Kg, 80% dos animais sobreviveram ao episódio convulsivo e foram sacrificados no final do experimento (Figura 7).

Figura 6. Efeito do Ácido Valpróico nas doses de 100 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 e 400 mg/Kg; i.p.) durante 14 dias e após 60 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, com n = 5 a 6 animais. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido de pós-teste de Tukey. (** p<0,005) vs Salina + P400.

Figura 7. Efeito do Ácido Valpróico nas doses de 100 e 400 mg/kg sobre a latência de morte no teste de convulsão induzida por pilocarpina em camundongos.



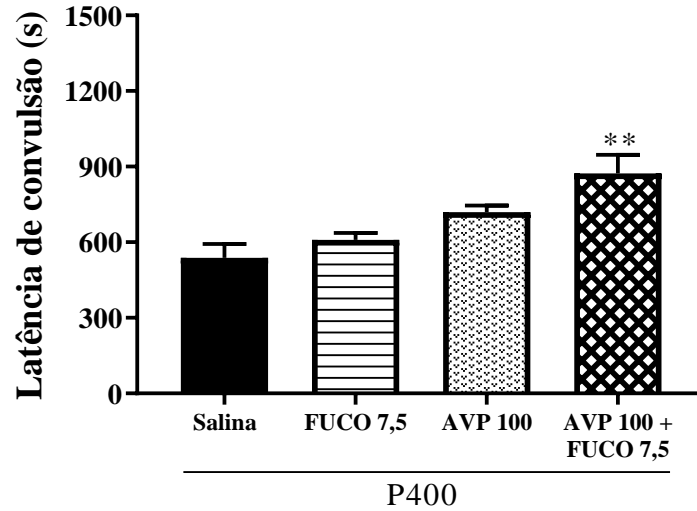
Grupos tratados com Ácido Valpróico nas doses (100 e 400 mg/Kg; i.p.) durante 14 dias e após 60 minutos do tratamento no 14^a dia foi induzida a convulsão com P400 (400 mg/Kg; i.p.). Os valores representam a média \pm EPM da latência de morte, com $n = 5$ a 6 animais. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido de pós-teste de Tukey. (## $p < 0,001$) vs Salina + P400.

5.1.3 Teste da Convulsão Induzida por Pilocarpina em camundongos tratados ou não com a associação de ácido valpróico 100 mg/Kg e Fucoidana 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 62% [AVP100+FUCO7,5: $873,6 \pm 73,79$] quando comparado com o grupo da pilocarpina [P400: $537,9 \pm 55,09$]. Foi verificada uma melhora do efeito do ácido valpróico na dose de 100 mg/kg quando associado a fucoidana (AVP100+FUCO7,5) (Figura 8).

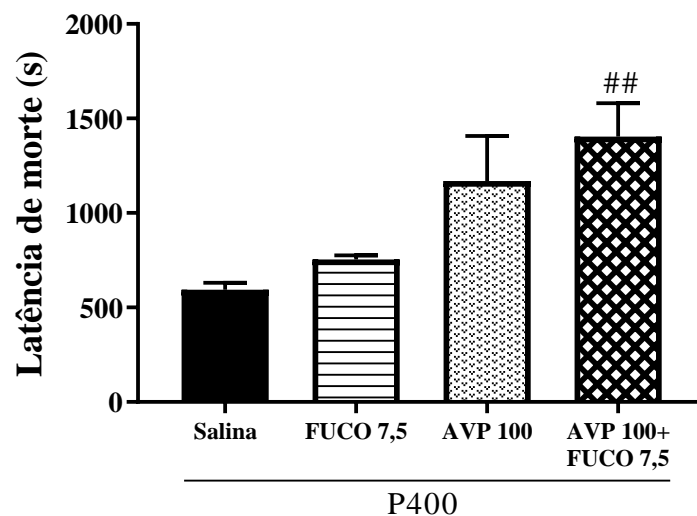
Foi verificado aumento na latência de morte (s) de 100% na associação de AVP100+FUCO7,5 [AVP100+FUCO7,5: $1403 \pm 178,2$] quando comparado com o grupo controle [P400: $594,6 \pm 36,43$]. Novamente foi observada uma melhora do efeito do ácido valpróico quando associado a fucoidana (AVP100+FUCO7,5) (Figura 9).

Figura 8. Efeito da associação de ácido valpróico na dose de 100 mg/Kg e fucoídiana 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 60 minutos foi induzida a convulsão com P400 (400 mg/Kg; i.p.). Os valores representam a média \pm EPM da latência de convulsão, com $n = 5$ a 6 animais. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido de pós-teste de Tukey. (** $p < 0,005$) vs Salina + P400.

Figura 9. Efeito da associação de ácido valpróico na dose de 100 mg/Kg e fucoídiana 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 60 minutos foi induzida a convulsão com P400 (400 mg/Kg; i.p.). Os valores representam a média \pm EPM da latência de morte, com n = 5 a 6 animais. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido de pós-teste de Tukey. (## p<0,001) vs Salina + P400.

Esses resultados demonstraram que o pré-tratamento com fucoïdãna nas doses analisadas foi capaz de reduzir a intensidade e a severidade das convulsões induzidas por pilocarpina em camundongos, prevenindo as alterações induzidas pela pilocarpina. Corroborando com os nossos resultados, estudos utilizando modelos animais de doenças neurodegenerativas como a doença Alzheimer, depressão e doença de Parkinson, demonstraram melhoras significativas das alterações comportamentais dos animais mediadas pela fucoïdãna e atribuíram esse efeito a possíveis ações neuroprotetoras desse composto (WOZNIAK *et al.*, 2015; CUI *et al.*, 2012; LI *et al.*, 2017).

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. Em um estudo realizado por ARAÚJO e colaboradores (2016), objetivando determinar uma subdose e a dose anticonvulsivante do AVP, no modelo de convulsão, testaram as doses de 100, 200 e 400 mg/kg e verificaram 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 fucoïdãna com o ácido valpróico, podemos observar uma melhora no efeito do AVP (100mg/kg) 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 com manutenção do efeito.

Sabemos que a maioria dos efeitos adversos dos antiepiléticos 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). Além disso, como a eficácia e a tolerabilidade das drogas existentes não melhoraram substancialmente nas últimas décadas, e todas as drogas antiepiléticas conhecidas apenas suprimem os sintomas sem tratar o distúrbio subjacente, são necessárias novas estratégias no desenvolvimento de drogas antiepiléticas (ZANG *et.al*, 20119).

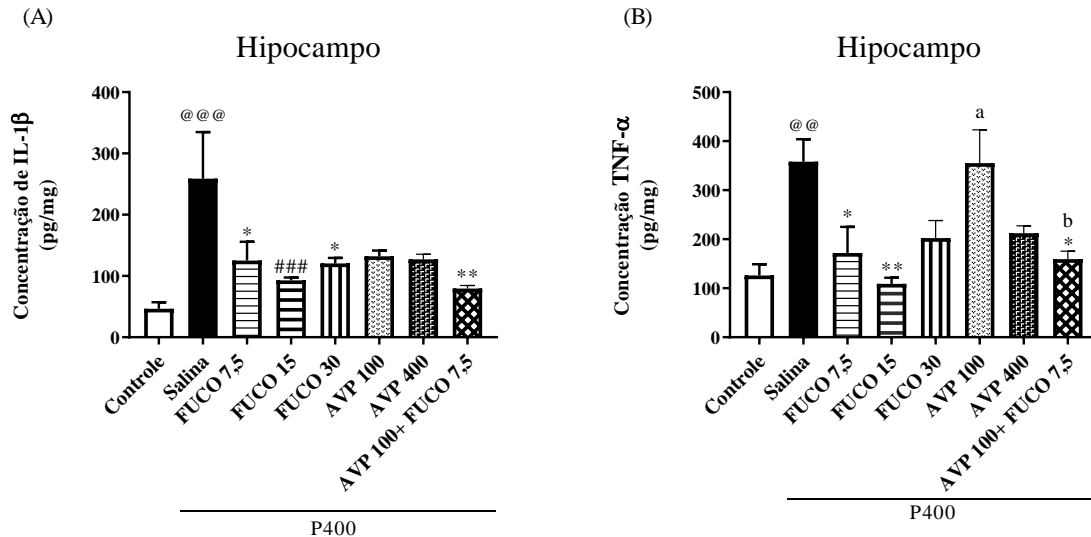
5.2 Quantificação dos níveis de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1), determinação da expressão do RNAm de mediadores neuroinflamatórios e fator neurotrófico (BDNF) através de PCR quantitativa em tempo real (qPCR) no tratamento com fucoídiana e/ou ácido valpróico no modelo de convulsão induzida por pilocarpina

Foi demonstrado em estudos um aumento nas transcrições de citocinas e os níveis de proteínas, tais como IL-1 β , TNF- α , nos cérebros dos animais após a indução do *status epiléptico* (SE) e após crises convulsivas generalizadas. Por tanto, os mediadores inflamatórios são expressos em tecido cerebral após a indução de convulsões em modelos animais e estão envolvidos na hiperexcitabilidade neuronal, frequência e duração de convulsões (SILVEIRA; OLIVEIRA; TEXEIRA, 2012).

Como resultado, verificou-se que a indução da convulsão com pilocarpina (400 mg/kg) provocou um aumento em cerca de 5 vezes a concentração da citocina pró-inflamatória IL-1 β no hipocampo quando comparado ao grupo tratado apenas com salina ($p < 0,0005$). O tratamento com FUCO nas doses 7,5, 15 e 30 mg/Kg foi capaz de reduzir a elevação dos níveis de citocina IL-1 β , induzida por P400, em torno de 40%. Embora o AVP nas doses de 100 e 400 mg/Kg sozinhos não tenham alterado os níveis de concentração de IL-1 β , provocada pela P400, a sua associação com fucoídiana (AVP100+FUCO7,5) provocou uma recuperação semelhante ao grupo de controle ($p < 0,005$). [Controle: $46,65 \pm 10,42$; Salina+P400: $258,9 \pm 76,08$; FUCO7,5+P400: $125,2 \pm 30,48$; FUCO15+P400: $92,77 \pm 4,797$; FUCO30+P400: $120,5 \pm 9,063$; AVP100+P400: $132,3 \pm 9,183$; AVP400+P400: $127,1 \pm 8,461$; AVP100+FUCO7,5+P400: $79,36 \pm 5,24$] (Figura 10.A).

Assim como foi observado os níveis de IL-1 β no hipocampo dos camundongos, a pilocarpina (P400) também provocou aumento na concentração de TNF- α ($p < 0,005$). O tratamento com FUCO nas doses de 7,5 e 15 mg/Kg e associação com ácido valpróico (AVP100+FUCO7,5) foi capaz de reduzir a elevação dos níveis TNF- α induzida por P400. Observamos que a subdose de AVP100 não apresentou efeito significativo com relação aos níveis de TNF- α no hipocampo, mas quando associado a fucoídiana (AVP100+FUCO7,5) houve uma recuperação dos níveis de TNF- α semelhante ao grupo controle [Controle: $126 \pm 22,86$; Salina+P400: $358,1 \pm 45,9$; FUCO7,5+P400: $171,9 \pm 53,26$; FUCO15+P400: $109 \pm 12,24$; FUCO30+P400: $202,4 \pm 35,72$; AVP100+P400: $355,1 \pm 68,16$; AVP400+P400: $212 \pm 15,01$; AVP100+FUCO7,5+P400: $159,5 \pm 16,23$] (Figura 10.B).

Figura 10. Efeito do tratamento com FUCO sozinha e/ou em associação com AVP na quantificação do nível de IL-1 β e TNF- α em hipocampo de camundongos 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.

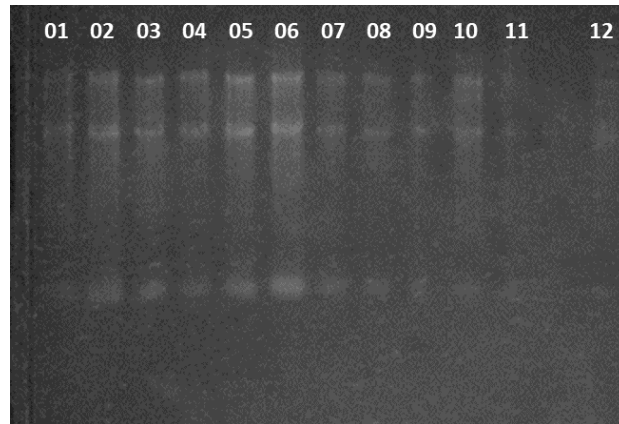


Os valores representam a média \pm EPM, com $n = 5$ a 6 animais. [A] IL-1 β : (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; ### $p < 0,0001$) vs salina, (@@ $p < 0,0005$) vs controle. [B] TNF- α : (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$) vs Salina + P400, (@@ $p < 0,005$) vs controle, (a $p < 0,05$) vs FUCO 7,5, (b $p < 0,05$) vs AVP100 (ANOVA seguido do teste de Tukey).

Para a determinação da expressão dos genes (IL-1 β , TNF- α e BDNF) em hipocampo dos diferentes grupos de tratamento foram realizadas através de PCR em Tempo Real (qPCR) utilizando o grupo Salina como calibrador e a expressão do gene constitutivo GAPDH como controle endógeno para a normalização dos referidos dados, demonstrando que o gene de controle endógeno utilizado não apresentou alteração entre os grupos analisados, sugerindo como normalizador eficiente para as condições analisadas.

Após a extração de RNA total, foi feita a Eletroforese em gel de agarose 1%, (Figura 11), para confirmar a extração e dar prosseguimento a leitura de qPCR (SOUZA, 2015). Após a análise do procedimento de Eletroforese, verificou-se que não houve dano aparente na estrutura da molécula, apresentando qualidade, podendo, assim, dar continuidade aos experimentos.

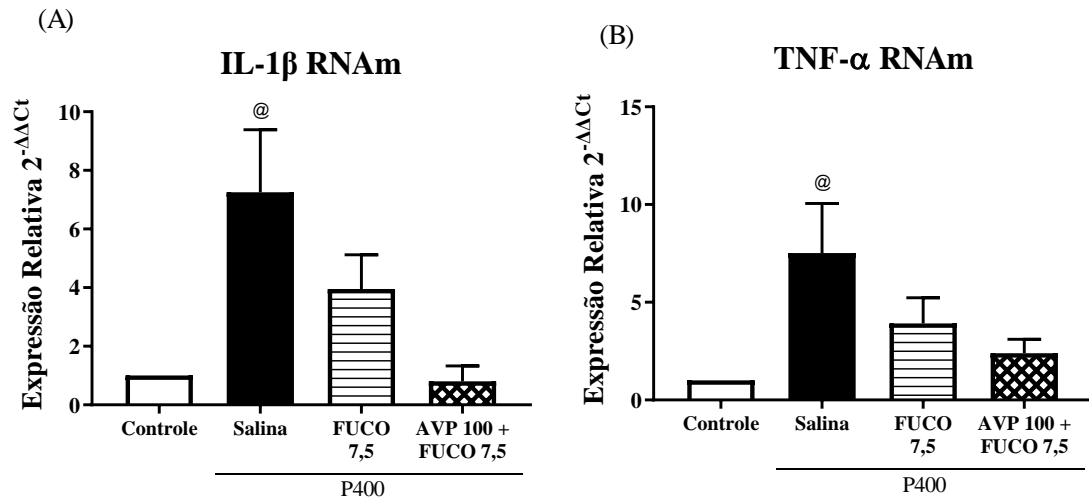
Figura 11. Eletroforese do RNA total isolado de hipocampo de camundongos.



As amostras de RNA total isoladas [Controle (01, 02 e 03); Salina+P400 (04, 05 e 06); FUCO7,5+P400 (07, 08 e 09); AVP100+FUCO7,5+P400 (10, 11 e 12)] foram ressuspensas em 50 μ L de água tratada com DEPC e, em seguida, analisadas por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (10 mg/ml).

De acordo com os resultados da análise de expressão relativa de genes realizados por qPCR, em hipocampo de camundongos, observou-se que os animais submetidos ao tratamento com fucoidana e /ou com associação de ácido valpróico, não apresentaram alterações significativas em relação ao grupo de pilocarpina nos níveis de RNAm de IL-1 β e TNF- α , porém houve significância, com $p < 0,05$, entre o grupo de pilocarpina (Salina+P400) quando comparado ao grupo controle [Níveis de RNAm de IL-1 β (Controle: 1,0; Salina+P400: $7,2 \pm 2,1$; FUCO7,5+P400: $3,9 \pm 1,2$; AVP100+FUCO7,5+P400: $0,8 \pm 0,5$) e de TNF- α (Controle: 1,0; Salina+P400: $7,5 \pm 2,5$; FUCO7,5+P400: $3,9 \pm 1,3$; AVP100+FUCO7,5+P400: $2,4 \pm 0,7$)] (Figura 12).

Figura 12. Análise do perfil de expressão do RNAm de IL-1 β e TNF- α em hipocampo.



Os animais foram submetidos ao teste de convulsão induzida por pilocarpina e tratados com Salina+P400, FUCO7,5+P400, AVP100+FUCO7,5+P400. Após a morte ou eutanásia, o hipocampo foi removido e criopreservado. Em seguida, foram extraídos os RNA's totais destas amostras e estes utilizados na síntese de cDNA, seguida pela reação de qPCR e análise da expressão (A) IL-1 β e (B) TNF- α pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Os genes foram normalizados através do uso do gene GAPDH. Os valores representam a média \pm EPM, com n = 3. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido de pós-teste de Dunnett. (@ p<0,05) vs controle.

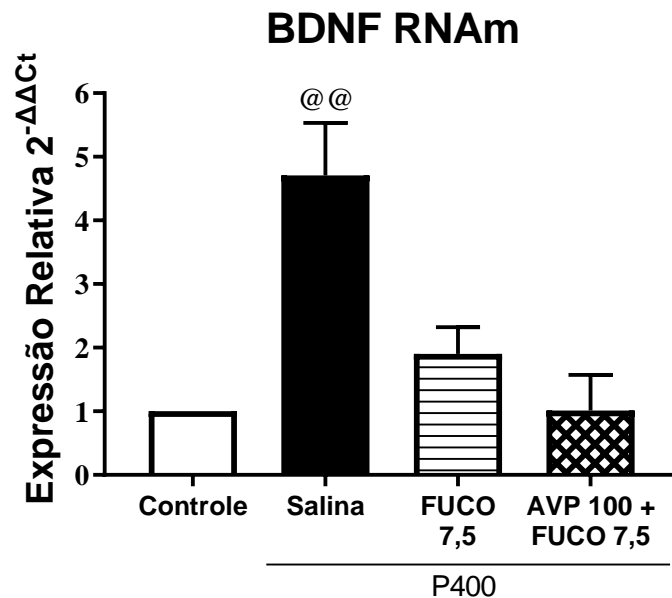
Os resultados mostram que houve redução das concentrações de citocinas próinflamatórias, IL-1 β e TNF- α , nos grupos tratados com fucoidana sozinha e em associação com ácido valpróico. Modelos animais de estimulação farmacológica ou elétrica das convulsões produzem convulsões acompanhadas de resposta inflamatória no cérebro destes animais, e estes mediadores inflamatórios apresentam estreita relação com parâmetros como: latência para início das convulsões, frequência, duração e gravidade das crises (MELO, 2017). Portanto, a melhora dos parâmetros comportamentais observados no nosso estudo pode estar relacionada a efeitos antiinflamatórios da fucoidana.

Similar aos nossos achados, Li et al., 2019, utilizando modelo de depressão em camundongos, verificaram que a administração fucoidiana previne o aumento da ativação da caspase-1 e a produção e liberação de IL-1 β , apresentando importante efeito antiinflamatório. Kang et al., 2012, verificaram que o tratamento com fucoidana inibiu a expressão do RNAm de algumas citocinas como IL-8, TNF- α and iNOS em cérebro de ratos submetidos a um modelo de injúria neuronal com LPS, sugerindo um possível efeito neuroprotetor da fucoidana.

Embora os nossos resultados tenham mostrado redução das concentrações das citocinas após o tratamento com fucoídana, não foram verificadas alterações na expressão gênica. Isso pode ter ocorrido devido ao número pequeno de amostras para os testes utilizando qPCR (n=3).

Quando analisado os níveis de BDNF através PCR quantitativo em tempo real, observou-se, um aumento nos níveis de RNAm do BDNF no grupo de pilocarpina em relação ao grupo de controle, com significância de $p < 0,005$ [Controle: 1,0; Salina+P400: $1,9 \pm 0,4$; FUCO7,5+P400: $4,3 \pm 1,2$; AVP100+FUCO7,5+P400: $4,3 \pm 1,4$] (Figura 13).

Figura 13. Análise do perfil de expressão do RNAm de BDNF em hipocampo.



Os animais foram submetidos ao teste de convulsão induzida por pilocarpina e tratados com Salina+P400, FUCO7,5+P400, AVP100+FUCO7,5+P400. Após a morte ou eutanásia, o hipocampo foi removido e criopreservado. Em seguida, foram extraídos os RNA's totais destas amostras e estes utilizados na síntese de cDNA, seguida pela reação de qPCR e análise da expressão de BDNF pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. O gene foi normalizado através do uso do gene GAPDH. Os valores representam a média \pm EPM, n = 3. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido de pós-teste de Dunnett. (** $p < 0,005$) vs controle.

Evidências apresentadas sugerem que o BDNF possui efeitos importantes na atividade neuronal, particularmente no hipocampo, com uma modulação rápida da transmissão sináptica excitatória e inibitória. Contudo, o BDNF é difusamente identificado através de todo o sistema nervoso central (SNC), mas constitutivamente é encontrado mais expresso no hipocampo, principalmente nas áreas correspondentes aos axônios de células granulares denteadas. Além

disso, o BDNF não é apenas expresso pelos neurônios, mas também é encontrado nos astrócitos e microglia, ambos desempenhando um papel importante na excitabilidade neuronal em condições fisiológicas e patológicas, incluindo a epilepsia (IUGHETTI *et al.*, 2018).

Nossos resultados demonstraram aumento nos níveis de RNAm do BDNF no grupo de pilocarpina em relação ao grupo de controle, apresentam significância, porém, pela análise dos gráficos observou-se uma tendência a redução nos grupos tratados com fucoídina sozinha e em associação com o ácido valpróico (AVP100+FUCO7,5), não apresentando significância devido ao reduzido número de amostras analisadas.

Alterações da expressão de fatores de transcrição e de genes de fatores neurotróficos têm sido fortemente envolvidos na cascata de eventos que levam a epilepsia. Corroborando com os nossos resultados, estudos recentes verificaram que os níveis de mRNA e de proteínas de BDNF estão elevados após convulsões (LAFRANCE *et al.*, 2010; MCNAMARA; SCHARFMAN, 2012).

A expressão de fatores neurotróficos induzidos por convulsões pode contribuir para as alterações estruturais e funcionais duradouras subjacentes à epileptogênese, o BDNF, um desses fatores neurotróficos, tem efeitos plásticos e pró-excitatórios sobre os neurônios e se encontra em altas concentrações nas áreas implicadas na epileptogênese. Os efeitos do BDNF na excitabilidade neuronal e seu papel crucial na epileptogênese está sendo constantemente estudado. No entanto ainda não está claro se a indução da potenciação sináptica mediada pelo BDNF ocorre primariamente por mecanismos pré-sinápticos (ex: aumento da liberação do glutamato) ou pós-sinápticos (ex: via fosforilação de receptores de neurotransmissores), ambos, receptores TrkB pré e pós sinápticos são importantes, especialmente no hipocampo. De maneira geral, o BDNF parece reduzir vias inibitórias (GABAérgicas) e ativar vias excitatórias (glutamatérgicas) (LI *et al.*, 2020).

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos sugerem que a fucoïdana apresentou efeito anti-inflamatório e neuroprotetor no modelo de convulsão induzido por pilocarpina. 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

- AKIHIRO, K. *et al.* Systematic synthesis of low-molecular weight fucoidan derivatives and their effect on cancer cells. **Org. Biomol. Chem.**, v. 13, p. 10556–10568, 2015.
- ALEXOPOULOS, A.V. Pharmaco resistant epilepsy: Definition and explanation. **Epileptology**, v. 1, p. 38-42, 2013.
- ARAUJO, A.B. **Estudo dos efeitos da fucoidana sozinha ou em associação com o ácido valpróico no modelo de convulsão induzido por pilocarpina em camundongos.** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Federal do Ceará, Sobral, 2016.
- BARBOSA, A. I. *et al.* Marine Polysaccharides in Pharmaceutical Applications: Fucoidan and Chitosan as Key Players in the Drug Delivery Match Field. **Mar. Drugs**, v. 17, p. 654, 2016.
- BOHLEN, O. V. BDNF effects on dendritic spine morphology and hippocampal function. **V. Cell Tissue Res.**, v. 373, p. 729-741, 2018.
- BOUVARD, C. *et al.* Low-Molecular-Weight Fucoidan Induces Endothelial Cell Migration via the PI3K/AKT Pathway and Modulates the Transcription of Genes Involved in Angiogenesis. **Mar. Drugs**, v. 13, p. 7446–7462, 2015.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada e Temática. **Avaliação e conduta da epilepsia na atenção básica e na urgência e emergência** [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Especializada e Temática; tradução de Li Li Min. – Brasília: Ministério da Saúde, 2018.
- BRASIL. Ministério da Saúde (MS). **Relatório Conitec: Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas (PCDT).** 2019.
- CARVALHO, M. A. J. *et al.* Proconvulsant effects of sildenafil citrate on pilocarpine-induced seizures: Involvement of cholinergic, nitrenergic and pro-oxidant mechanisms. **Brain Research Bulletin**, v. 149, p. 60-74, 2019.
- CHE, N.; MA, Y.J.; Xin, Y.H. Protective role of fucoidan in cerebral ischemia-reperfusion injury through inhibition of MAPK signaling pathway. **Biomol Ther**, v. 25 p. 272-278, 2017.
- CHENG, J. *et al.* Targeting pericytes for therapeutic approaches to neurological disorders. **Acta Neuropathol.**, v. 136, p. 507-523, 2018.
- CHEN, Z. *et al.* Treatment outcomes in patients with newly diagnosed epilepsy treated with established and new antiepileptic drugs: a 30-year longitudinal cohort study. **JAMA Neurol**, v. 75, p. 279–286, 2018.
- CHOLLET, L. *et al.* Fucoidans in nanomedicine. **Mar Drugs**, v. 14, p. 145, 2016.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anal Biochem**, v. 9, p. 156–162, 1987.

CUI, Y. Q. *et al.* Fucoidan Protects against Lipopolysaccharide-Induced Rat Neuronal Damage and Inhibits the Production of Proinflammatory Mediators in Primary Microglia. **Neurosciences e Therapeutics**, v. 18, p. 827-833, 2012.

DEY, A. *et al.* Anti-Inflammatory Small Molecules To Treat Seizures and Epilepsy: From Bench to Bedside. **Trends in pharmacological sciences**, v. 37, p. 463-484, 2016.

DINESH, S. *et al.* In vitro anti-HIV-1 activity of fucoidan from *Sargassum swartzii*. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 82, p. 83–88, 2016.

DREIFUSS *et al.* Proposal for revised clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures. From the Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. **Epilepsia**, v. 22, p.489-501, 1981.

FERRUZZI, E. H. **Perfil do paciente epiléptico indígena da aldeia Jaguapirú, na região de Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil**. 2018. 170 p. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

FISHER, R. S. *et al.* Instruction manual for the ILAE 2017 operational classification of seizure types. **Epilepsia**, v. 58, p. 531-542, 2017.

FISHER, R. S.; BONNER, A. M. The Revised Definition and Classification of Epilepsy for Neurodiagnostic Technologists. **Neurodiagnostic Journal**, v. 58, p. 1–10, 2018.

GAO, F. *et al.* Alteration of plasma cytokines in patients with active epilepsy. **Acta Neurologica Scandinavica**, v.135, p. 663–669, 2017.

GOMES, D. *et al.* Consensus Protocol for the Treatment of Super-Refractory Status Epilepticus. **Acta Med Port**, v. 31, p. 598-605, 2018.

GROSS, A. *et al.* Toll-like receptor 3 deficiency decreases epileptogenesis in a pilocarpine model of SE-induced epilepsy in mice. **Epilepsia**, v. 58, p. 586–596, 2017.

GUERREIRO, C.A.M. História do surgimento e desenvolvimento das drogas antiepilépticas. **J Epilepsy Clin Neurophysiol**, v.12, n.1, p.18-21, 2006

HADDAD, O. *et al.* Heparanase and Syndecan-4 Are Involved in Low Molecular Weight Fucoidan-Induced Angiogenesis. **Mar. Drugs**, v.13, p. 6588–6608, 2015.

HIFNEY, A.F. *et al.* Industrial optimization of fucoidan extraction from *Sargassum* sp. and its potential antioxidant and emulsifying activities. **Food Hydrocoll.**, v. 54, p 77-88, 2016.

HO, Y. H. *et al.* Peripheral inflammation increases seizure susceptibility via the induction of neuroinflammation and oxidative stress in the hippocampus. **Journal of Biomedical Science**, v. 22, p. 1–14, 2015.

HSU, H. Y.; HWANG, P.A. Clinical applications of fucoidan in translational medicine for adjuvant cancer therapy. **Clin. Transl. Med.**, v. 8, p. 15, 2019.

ISNANSETYO, A.; FIKRIYAH, A.; KASANAHA, N. Non-specific immune potentiating activity of fucoidan from a tropical brown algae (Phaeophyceae), *Sargassum cristaefolium* in tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquac. Int.**, v.24, p. 465–477, 2016.

IUGHETTI, L. *et al.* Brain-derived neurotrophic factor and epilepsy: a systematic review. **Neuropeptides**, v. 72, p. 23–29, 2018.

JAFARPOUR, S. *et al.* Seizure cluster: Definition, prevalence, consequences, and management. **Seizure**, v. 68, p. 9-15, 2018.

KANG, G.H. *et al.* Neuroprotective effect of fucoidin on lipopolysaccharide accelerated cerebral ischemic injury through inhibition of cytokine expression and neutrophil infiltration. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 318, p. 25-30, 2012.

KIM, H. *et al.* Pretreated *fucoidan* confers neuroprotection against transient global cerebral ischemic injury in the gerbil hippocampal CA1 area via reducing of glial cell activation and oxidative stress. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 109, p. 1718-1727, 2019.

KOUTROUMANIDIS, M. *et al.* The role of EEG in the diagnosis and classification of the epilepsy syndromes: a tool for clinical practice by the ILAE Neurophysiology Task Force (Part 2). **Epileptic Disorders**, v. 19, p. 385–437, 2017.

KLEMENT, W. *et al.* A pericyte-glia scarring develops at the leaky capillaries in the hippocampus during seizure activity. **Epilepsia**, v. 28, p. 1399-1411, 2019.

KUSAYKIN, M. *et al.* Structure, biological activity, and enzymatic transformation of fucoidans from the brown seaweeds. **Biotechnol. J.**, v. 3, p. 904–915, 2015.

KYLIN, H. Zur Biochemie der Meeresalgen. **Z Physiol Chem**, v. 83, p. 171–197, 1913.

KWAK, J.Y. Fucoidan as a marine anticancer agent in preclinical development. **Mar. Drugs**, v. 12, p. 851–870, 2014.

LAFRANCE, W. C. *et al.* Decreased serum BDNF levels in patients with epileptic and psychogenic nonepileptic seizures. **Neurology**, v. 75, p. 1285–1291, 2010.

LI, J.J. *et al.* The natural product fucoidan ameliorates hepatic ischemia-reperfusion injury in mice. **Biomed. Pharmacother.**, v. 94, p. 687-696, 2017.

LI, M. *et al.* *Fucoidan* exerts antidepressant-like effects in mice via regulating the stability of surface AMPARs. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 521, p. 318-325, 2020.

LIN, T.W. *et al.* Targeting BDNF/TrkB pathways for preventing or suppressing epilepsy. **Neuropharmacology**, 107734, 2019.

- LIU, B. *et al.* Edible seaweed as future functional food: Identification of α -glucosidase inhibitors by combined use of high-resolution α -glucosidase inhibition profiling and HPLC–HRMS–SPE–NMR. **Food Chem.**, v. 203, p. 16–22, 2016.
- LIVAK, K.J.; SCHMITTEN, T.D. Analysis of gene expression. Data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.
- LOCOCK, C. Discussion of a paper by E. H. Sievking: meeting of the Royal Medical and Chirurgical Society of London. **Lancet.**, v. 1, p. 527, 1857.
- LUGRIN, J. *et al.* The role of oxidative stress during inflammatory processes. **Biological chemistry**, v. 395, n. 2, 203- 230, 2014.
- MCNAMARA, J.O.; SCHARFMAN, H.E. In **Temporal lobe epilepsy and the BDNF receptor, *TrkB***; Noebels, J.L.; Avoli, M.; Rogawski, M.A.; Olsen, R.W.; Delgado-Escueta, A.V. Ed.; Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies: US, 2012.
- MELO, C.G.F. **Efeito anticonvulsivante do monoterpreno sintético (1s)-(-)-verbenona em animais de laboratório por metodologias específicas comportamentais.** Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, **2017**.
- MORONEY, N.C. *et al.* Seaweed polysaccharides (laminarin and fucoidan) as functional ingredients in pork meat: An evaluation of anti-oxidative potential, thermal stability and bioaccessibility. **Mar. Drugs**, v. 13, p. 2447–2464, 2015.
- MYERS, S.P. *et al.* A combined Phase I and II open-label study on the immunomodulatory effects of seaweed extract nutrient complex. **Biol. Targets Ther.**, v. 5, p. 45–60, 2011.
- OH, J.Y.; FERNANDO, I.S.; Jeon, Y.J. Potential applications of radioprotective phytochemicals from marine algae, **Algae**, v. 31, p. 403-414, 2016.
- PARK, H.Y. *et al.* Anti-inflammatory effects of fucoidan through inhibition of NF-kappaB, MAPK and Akt activation in lipopolysaccharide-induced BV2 microglia cells. **Food Chem. Toxicol.**, v. 49, p. 1745-1752, 2011.
- RACINE, R. Modification of seizure activity by electrical stimulation: I. after-discharge threshold. **Electroencephalography and Clinical Neurophysiology**, v. 32, p. 269-279, 1972.
- ROMOLI1, M. *et al.* Valproic Acid and Epilepsy: From Molecular Mechanisms to Clinical Evidences. **Current Neuropharmacology**, v. 17, p. 926-946, 2019.
- SCHEFFER, I. E. *et al.* ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. **Epilepsia**, v. 58, p.512-521, 2017.
- SHAN, X.D. *et al.* In vitro and in vivo hypoglycemic effects of brown algal fucoidans. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 82, p. 249–255, 2016.
- SILVEIRA, G.; OLIVEIRA, A.C.P.; TEIXEIRA, A.L. Insights into inflammation and epilepsy from the basic and clinical sciences. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 19, p. 1071-1075, 2012.

SOUZA, R.B. **Alga marinha vermelha *Gracilaria cornea*: novas perspectivas biotecnológicas e implicações neurofarmacológicas**. Doutorado em Bioquímica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015.

Sun, Z. *et al.* Myricetin attenuates the severity of seizures and neuroapoptosis in pentylentetrazole kindled mice by regulating the of BDNF-TrkB signaling pathway and modulating matrix metalloproteinase-9 and GABA_A. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 17, p. 3083–3091, 2019a.

Sun, Y. *et al.* Interleukin-10 inhibits interleukin-1 β production and inflammasome activation of microglia in epileptic seizures. **Journal of Neuroinflammation**, v. 16, p. 1–13, 2019b.

TAKAHASHI, H. *et al.* An exploratory study on the anti-inflammatory effects of fucoidan in relation to quality of life in advanced cancer patients. **Integr Cancer Ther**, v. 17, p. 282–291, 2018.

TERRONE, G. *et al.* Inhibition of monoacylglycerol lipase terminates diazepam-resistant status epilepticus in mice and its effects are potentiated by a ketogenic diet. **Epilepsia**, v. 59, p. 79-91, 2018.

TERRONE, G. *et al.* Inflammation and reactive oxygen species as disease modifiers in epilepsy. **Neuropharmacology**, 107742, p. 1 - 10, 2019.

THIJS, R.D. *et al.* Epilepsy in adults. **Lancet**, v. 393, p. 689-701, 2019.

TISSOT, B.; DANIEL, R. Biological properties of sulfated fucans: The potent inhibiting activity of algal fucoidan against the human complement system. **Glycobiology**, v. 13, p. 29–30, 2003.

TOMSON, T.; BATTINO, D.; PERUCCA, E. Valproic acid after five decades of use in epilepsy: time to reconsider the indications of a timehonoured drug. **Lancet Neurol.**, v. 15, p. 210-218, 2016.

USTYUZHANINA, N.E. *et al.* Fucoidans: pro- or antiangiogenic agents? **Glycobiology**, v. 24, p. 1265–1274, 2014.

VAN VLIET, E.A. *et al.* Review: neuroinflammatory pathways as treatment targets and biomarker candidates in epilepsy: emerging evidence from preclinical and clinical studies. **Neuropathol. Appl. Neurobiol.**, v. 44, p. 91-111, 2018.

VAZQUEZ, M. *et al.* Hyperammonemia Associated with Valproic Acid Concentrations. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-7, 2014.

WANG, W.; WANG, S.X.; GUAN, H.S. The Antiviral Activities and Mechanisms of Marine Polysaccharides: An Overview. **Mar. Drugs**, v. 10, p. 2795–2816, 2012.

WANG, Y. *et al.* Fucoidan from sea cucumber *Cucumaria frondosa* exhibits anti-hyperglycemic effects in insulin resistant mice via activating the PI3K/PKB pathway and GLUT4. **J. Biosci. Bioeng.**, v. 121, p. 36–42, 2016.

WEN, Z.S. *et al.* Composition and anti-inflammatory effect of polysaccharides from *Sargassum horneri* in RAW264.7 macrophages. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 88, p. 403–416, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2019. Disponível em <<http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/depression>> Acesso em: 08 de janeiro de 2019.

WOZNIAK, M. *et al.* Anti-HSV1 activity of brown algal polysaccharides and possible relevance to the treatment of Alzheimer's disease. **Jornal Biol Macromol**, p. 530-540, 2015.

WU, G.J. *et al.* Anti-inflammatory activity of a sulfated polysaccharide from the brown alga *Sargassum cristaefolium*. **Food Hydrocoll.**, v. 53, p.16–23, 2016.

WURZELMANN, M.; ROMEIKA, J.; SUN, D. Therapeutic potential of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and a small molecular mimics of BDNF for traumatic brain injury. **Neural Regen. Res.**, v. 12, p. 7–12, 2017.

YACUBIAN, E. M. T. Eficácia e Efeitos Adversos dos Fármacos Antiepilépticos. **LBE**, 2017.

YACUBIAN, E. M. *et al.* **Classificação Operacional dos Tipos de Crises Epilépticas pela International League Against Epilepsy**: documento da posição da Comissão da ILAE de Classificação e terminologia – Tradução pela Comissão de Consenso da Liga Brasileira de Epilepsia, 2017-a.

YACUBIAN, E. M. *et al.* **Classificação da ILAE das epilepsias**: artigo da posição da Comissão e Terminologia da International League Against Epilepsy. Traduzido pela Comissão de Consenso da Liga Brasileira de Epilepsia, 2017-b.

ZAPOROZHETS, T.; BESEDNOVA, N. Prospects for the therapeutic application of sulfated polysaccharides of brown algae in diseases of the cardiovascular system: Review. **Pharm. Biol.**, v. 54, p. 3126-3135, 2016.

ZHANG, X. *et al.* The Anticonvulsant Effects of Baldrial on Pilocarpine-Induced convulsion in Adult Male Mice. **Molecules**, v. 24, p. 1-15, 2019.

ZHAO, X. *et al.* Antithrombotic activity of oral administered low molecular weight fucoidan from *Laminaria Japonica*. **Thromb. Res.**, v. 144, p. 46–52, 2016.

**ANEXO – PARECER DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO
ANIMAL (CEUA)**



Universidade Federal do Ceará – *Campus Sobral*
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA
Rua: Av. Comte. Maurocélvio Rocha Pontes, 100, Derby
CEP: 62.042-280 Sobral-CE
Fone/Fax: (88) 3611.8000

C E R T I F I C A D O

Certificamos que a proposta intitulada: **Efeito anti-inflamatório e neuroprotetor do polissacarídeo sulfatado de alga parda (fucoídano) sozinho ou associado ao ácido valpróico no modelo de convulsão induzido por pilocarpina em camundongos**, registrada com o nº **9/18**, sob a responsabilidade da **Profa. Dra. Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) *Campus Sobral*, em reunião de 26/02/2019.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	26/02/2019 até 15/12/2021
Espécie/linhagem/raça	Camundongos heterogênicos <i>Swiss</i>
Nº de animais	Camundongos: 144
Peso/Idade	Camundongos: 25-30g/2-3meses.
Sexo	Camundongos: 144♂(machos)
Origem	Biotério Central de Fortaleza

Sobral, 24 de abril de 2019.

Prof. Dr. Igor Iuco Castro da Silva
Vice-coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA