



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

ANNYTA FERNANDES FROTA

**INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE NEUROPROTETORA DE POLISSACARÍDEOS
SULFATADOS DE ALGAS MARINHAS EM MODELOS *IN VITRO* DE
NEUROINFLAMAÇÃO E *IN VIVO* DE PARKINSON**

FORTALEZA

2020

ANNYTA FERNANDES FROTA

INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE NEUROPROTETORA DE POLISSACARÍDEOS
SULFATADOS DE ALGAS MARINHAS EM MODELOS *IN VITRO* DE
NEUROINFLAMAÇÃO E *IN VIVO* DE PARKINSON

Tese ou Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutorado em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal

Orientador: Prof. Dra. Norma Maria Barros Benevides.

Coorientador: Prof. Dra. Silvia Lima Costa.

FORTALEZA

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)

- F96li Frota, Annyta Fernandes.
Investigação da atividade neuroprotetora de polissacarídeos sulfatados de algas marinhas em modelos *in vitro* de neuroinflamação e *in vivo* de Parkinson / Annyta Fernandes Frota. – 2020.
163 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2020.
Orientação: Profa. Dra. Norma Maria Barros Benevides.
Coorientação: Profa. Dra. Silvia Lima Costa.
1. Galactanas Sulfatadas. 2. Neuroproteção. 3. Células Gliais. 4. Doença de Parkinson. I. Título.
CDD 572
-

ANNYTA FERNANDES FROTA

INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE NEUROPROTETORA DE POLISSACARÍDEOS
SULFATADOS DE ALGAS MARINHAS EM MODELOS *IN VITRO* DE
NEUROINFLAMAÇÃO E *IN VIVO* DE PARKINSON

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de doutor em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Aprovada em: 29/01/2020.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dra. Ana Cristina de Oliveira Monteiro Moreira
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

Prof. Dra. Ticiano Monteiro Abreu
Centro Universitário UNIGRANDE

Prof. Dra. Maria Gonçalves Pereira
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Prof. Dr. Renato Azevedo Moreira
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

A Deus.

Aos meus pais, Antônio Frota e Neuracir
Brandão.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro, através do Projeto Universal (chamada no. 14/2013. Processo no. 475475/2013-5).

À Universidade Federal do Ceará, por proporcionar a realização do doutoramento através do Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Laboratório de Carboidratos e Lectinas. Pelo aprendizado repassado pelo corpo docente.

À Universidade Federal da Bahia, por permitir a mobilidade acadêmica para realização de doutorado sanduiche (nacional), junto ao Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular.

À EMBRAPA, por possibilitar a realização de análises para este estudo, através do Pesquisador Dr. Guilherme Julião Zocolo, junto ao Laboratório Multiusuário de Química de Produtos Naturais.

À APAFG, pelo suporte e parceria no cultivo e aquisição das algas marinhas utilizadas neste estudo.

Ao LABPIM, pela contribuição nas análises dos polissacarídeos sulfatados.

À UNIFOR, pela contribuição nas análises de infravermelho dos polissacarídeos sulfatados.

À minha Família, por todo apoio incondicional durante esta jornada.

À Profa. Dra. Norma Benevides, por suas orientações, confiança, por sua amizade e por toda dedicação e esforço para com os seus alunos, pelo cuidado além da academia, e por não medir esforços em busca de proporcionar o melhor. Muito Obrigada!

À Profa. Dra. Silvia Costa, pela coorientação, ensinamentos e acolhimento durante os dois anos de doutoramento junto ao seu laboratório.

Aos colegas do Laboratório de Carboidratos e Lectinas – CarboLec,

Aos colegas do Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular – LabNq/UFBA.

À Profa. Dra. Nágila Ricardo, pelo auxílio e suporte nas análises de GPC.

Aos Profs. Dr. Victor Diógenes, Dra. Rejane Santana, Dra. Fátima Dias, Dr. Ramon El-Bachá, Dr. Ryan Costa, por seus ensinamentos.

Ao Rogênio Mendes, pelo suporte no experimento de FT-IR.

Aos amigos, Livia Bacelar, Jéssika Amparo, Deivison Argolo, Rafael Short, Luciana Freitas, Érica Novaes, Fillipe Mendes, Vanessa Amorim, Ana Elisa, Rodrigo Souza,

Beto e Jamile Gomes, obrigada por toda ajuda, ensinamentos, paciência, dedicação, amizade, momentos de descontração, boas risadas e pela perseverança em fazer uma cearense virar baiana. Vocês foram peças fundamentais para este trabalho e para minha vida pessoal, tornando esses dois anos longe de casa, mais agradável.

Aos alunos de iniciação científica, Pedro Nonato, Ramon Mota e Helayne Gomes, por toda ajuda, dedicação e responsabilidade durante as etapas desse trabalho, vocês foram fundamentais, meus mais sinceros agradecimentos.

Aos funcionários da Universidade Federal do Ceará e Universidade Federal da Bahia, pela atenção e disponibilidade.

Aos meus irmãos, Silvia Frota, Frota Júnior e Francisco Frota, por todo carinho, apoio durante todos esses anos, por sempre estarem presentes quando precisei.

Ao meu sobrinho, João Victor, por tornar meus dias mais felizes com a sua alegria contagiante. Sua presença foi fundamental nas horas difíceis,

Aos meus pais, por serem meu porto seguro, por caminharem ao meu lado, pelo apoio, acreditando que tudo ficaria bem e por não me deixarem desistir frente as adversidades.

Aos ratos, que mesmo sem escolha, sacrificaram suas vidas em prol da pesquisa e da realização deste trabalho.

Obrigada a todos!
Em cada página deste trabalho há um pouquinho de vocês.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes.” (Marthin Luther King)

RESUMO

O ambiente marinho é conhecido como uma fonte rica de compostos químicos com inúmeros efeitos benéficos à saúde. Entre os organismos marinhos, destacam-se as algas marinhas. Embora tenham sido reconhecidas como fontes valiosas de compostos bioativos, ainda se apresentam como um recurso pouco explorado. Atualmente, várias linhas de estudos forneceram informações sobre atividades biológicas e efeitos neuroprotetores das algas marinhas, incluindo atividade antioxidante, anti-neuroinflamatória e de inibição da morte neuronal. Portanto, as algas marinhas possuem grande potencial para serem exploradas na neuroproteção como parte de produtos farmacêuticos, nutracêuticos e alimentos funcionais. As espécies das algas vermelhas *Gracilaria cornea*, *Gracilaria birdiae* e *Hypnea pseudomusciformis*, apresentam-se como fonte natural ainda pouco explorada como potenciais bioativos. Seus polissacarídeos sulfatados (PS), do tipo agarana e carragenana, já possuem estrutura caracterizada e efeitos biológicos reportados na literatura. Deste modo, o presente estudo objetivou avaliar os efeitos neuroprotetores de PS e possíveis mecanismos de ação em modelo de neuroinflamação glial *in vitro* e neurodegeneração *in vivo*. Para avaliação da neuroinflamação induzida por aminocromo *in vitro*, os PS (10 µg/mL) foram incubados em células gliais por 24 h. Para a investigação do potencial neuroprotetor *in vivo*, ratos receberam injeção intraestriatal da neurotoxina 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA), e posterior tratamento sub-crônico, via oral, com os PS (0,3; 3,0 e 30 mg/Kg) durante 14 dias consecutivos. Uma hora após o último tratamento os animais foram submetidos a análises neurocomportamentais. As áreas cerebrais foram dissecadas e utilizadas para análises neuroquímicas e transcricionais. PS das algas *G. cornea*, *G. birdiae* e *H. pseudomusciformis*, promoveram efeito neuroprotetor em células gliais, induziram proliferação microglial e astrocitária, através da modulação de fatores neurotróficos. Além disso, promoveram uma atividade neuroprotetora *in vivo*, através de indução de glutatona reduzida, redução dos níveis de peroxidação lipídica e de nitrito, e modulação de vias transcricionais em corpo estriado de ratos, retornando as atividades locomotoras a condições normais. Desta forma, o presente estudo apresenta novas perspectivas biotecnológicas de PS de algas marinhas e sugere novas implicações neurofarmacológicas para o uso da galactanas sulfatada de *G. cornea*, *G. birdiae* e *H. pseudomusciformis*.

Palavras-chave: Galactanas Sulfatadas. Neuroproteção. Células gliais. Doença de Parkinson.

ABSTRACT

The marine environment is known as a rich source of chemical compounds with numerous beneficial health effects. Among marine organisms, we highlight marine algae. Although they have been recognized as valuable sources of bioactive compounds, they are still a little explored resource. Currently, several lines of studies have provided information on biological activities and neuroprotective effects of seaweed, including antioxidant, anti-neuroinflammatory and neuronal death inhibition activity. Therefore, seaweed has great potential to be explored in neuroprotection as part of pharmaceutical, nutraceutical and functional foods. The species of the red algae *Gracilaria cornea*, *Gracilaria birdiae* and *Hypnea pseudomusciformis*, present themselves as a natural source still little explored as potential bioactive. Its sulfated polysaccharides (SP), of the type agarana and carrageenan, already have a characterized structure and biological effects reported in the literature. Thus, the present study aimed to evaluate the neuroprotective effects of SP and possible mechanisms of action in a model of glial neuroinflammation *in vitro* and neurodegeneration *in vivo*. In order to assess aminochrome-induced neuroinflammation *in vitro*, SP (10 µg/mL) were incubated in glial cells for 24 h. For the investigation of the neuroprotective potential *in vivo*, rats received nigrostriatal injection of the neurotoxin 6-hydroxidopamine (6-OHDA), and subsequent sub-chronic treatment, orally, with SP (0.3, 3.0 and 30 mg/Kg) for 14 consecutive days. One hour after the last treatment, the animals were submitted to neurobehavioral analysis. The brain areas were dissected and used for neurochemical and transcriptional analyzes. SP of the algae *G. cornea*, *G. birdiae* and *H. pseudomusciformis*, promoted a neuroprotective effect in glial cells, induced microglial and astrocytic proliferation, through the modulation of neurotrophic factors. In addition, they promoted a neuroprotective activity *in vivo*, through reduced glutathione induction, reduced levels of lipid peroxidation and nitrite, and modulation of transcriptional pathways in rat striatum, returning locomotor activities to normal conditions. Thus, the present study presents new biotechnological perspectives of SP of seaweed and suggests new neuropharmacological implications for the use of the *G. cornea*, *G. birdiae* and *H. pseudomusciformis* galactans.

Keywords: Sulfated Galactans. Neuroprotection. Glial cells. Parkinson's disease.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|-----|
| Figura 1 – Perspectivas biomédicas de polissacarídeos derivados de algas marinhas | 24 |
| Figura 2 – Estrutura química representativa de carragenanas..... | 26 |
| Figura 3 – Estruturas químicas de unidades de carragenanas..... | 26 |
| Figura 4 – Estrutura química representativa de agaranas..... | 28 |
| Figura 5 – Células do Sistema Nervoso Central..... | 35 |
| Figura 6 – Representação Esquemática da Mudança de Fenótipo da Microglia..... | 38 |
| Figura 7 – Modelo de Doença de Parkinson Induzido por Injeção Unilateral de 6-OHDA..... | 44 |
| Figura 8 – Conversão do Aminocromo a Leucoaminocromo-O-semiquinona..... | 45 |
| Figura 9 – Imagem Ilustrativa de Espécimes de Algas Marinhas..... | 49 |
| Figura 10 – Esquema da Extração dos Polissacarídeos Sulfatados Totais..... | 50 |
| Figura 11 – Transformação do MTT em Formazan..... | 54 |
| Figura 12 – Teste de Exclusão do Azul de Tripán..... | 55 |
| Figura 13 – Esquema Ilustrativo do Design Experimental..... | 112 |
| Figura 14 – Esquema Ilustrativo da Injeção Intracerebroventricular de 6-OHDA..... | 113 |
| Figura 15 – Teste do Campo Aberto..... | 114 |
| Figura 16 – Teste do Cilindro..... | 115 |
| Figura 17 – Ilustração do Teste Rotacional..... | 115 |
| Figura 18 – Reação de Griess..... | 116 |
| Figura 19 – Reação do Ácido Tiobarbitúrico com o Malondialdeído..... | 117 |
| Figura 20 – Reação entre a Glutationa Reduzida e o Reagente de Ellman..... | 118 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|-----|
| Tabela 1 – Protocolo Experimental..... | 112 |
|--|-----|

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-----------------------|---|
| AP | Antero-posterior |
| ARG-1 | Arginase 1 |
| BDNF | Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro |
| BSA | Albumina sérica bovina |
| cDNA | DNA complementar |
| CEUA | Comissão de Ética no Uso de Animal |
| Cg | Carragenana |
| Ct | <i>Cycle threshold</i> |
| DP | Doença de Parkinson |
| DTNB | Ácido 2-nitrobenzóico |
| DTT | Ditiotreitol |
| DV | Dorso Vertral |
| EDTA | Ácido etilenodiamino tetra-acético |
| EPM | Erro padrão da média |
| EROS | Espécies reativas de oxigênio |
| FT-IR | Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier |
| GAGS | Glicosaminoglicano |
| Gb | <i>Gracilaria birdiae</i> |
| Gc | <i>Gracilaria cornea</i> |
| GFAP | Proteína ácida fibrilar glial |
| GSH | Glutathiona reduzida |
| GSSG | Glutathiona oxidada |
| GSTNB | Aduto Glutathiona-ácido 2-nitro-5-mercapto-benzóico |
| Hp | <i>Hypnea pseudomusciformis</i> |
| IL-1 β | Interleucina 1 beta |
| iNOS/NOS ₂ | Óxido nítrico sintase induzida |
| ipsi | Ipsilateral |
| KBr | Brometo de potássio |
| MDA | Malonaldeído |
| ML | Médio-lateral |
| N | Quantidade de animais por grupo |

| | |
|----------------|---|
| NCBI | <i>National Center for Biotechnology Information</i> |
| NEED | N-naftil-etilenodiamina |
| NMDA | N-metil D-aspartato |
| NF- κ B | Fator nuclear kappa B |
| <i>Per os</i> | Via oral |
| PKA | Proteína quinase A |
| PST | Polissacarídeos sulfatados totais |
| RT-qPCR | PCR em tempo real |
| RMN | Ressonância magnética nuclear |
| SBCAL | Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório |
| SFB | Soro fetal bovino |
| SNC | Sistema nervoso central |
| SNpc | Substância nigra pars compacta |
| TBARS | Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico |
| TNB | Ácido 2-nitro-5-mercapto-benzóico |
| TNF | Fator de necrose tumoral alfa |
| U | Unidades |
| β -Act | Beta actina |
| 6-OHDA | 6-Hidroxidopamina |

SUMÁRIO

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 19 |
| 2 | REVISÃO DE LITERATURA | 20 |
| 2.1 | Algas Marinhas | 20 |
| 2.1.1 | <i>Importância Comercial</i> | 21 |
| 2.2 | Polissacarídeos Sulfatados | 22 |
| 2.3 | Diversidade Estrutural de Polissacarídeos Sulfatados | 24 |
| 2.3.1 | <i>Carragenanas e Agaranas de Algas Marinhas</i> | 25 |
| 2.4 | Bioatividade de Polissacarídeos Sulfatados de Algas Marinhas | 29 |
| 2.4.1 | <i>Potencial Antioxidante</i> | 29 |
| 2.4.2 | <i>Potencial Neuroprotetor</i> | 30 |
| 2.5 | Sistema Nervoso Central: Importância da sua Integridade Funcional | 32 |
| 2.6 | Células da Glia | 33 |
| 2.6.1 | <i>Astrócitos e sua Função no SNC</i> | 35 |
| 2.6.2 | <i>Resposta das Microglias no SNC</i> | 36 |
| 2.7 | Neurodegeneração | 38 |
| 2.7.1 | <i>Neurodegeneração e Plasticidade Neuronal</i> | 39 |
| 2.8 | Doença de Parkinson: Desafios e Perspectivas | 39 |
| 2.8.1 | <i>Envolvimento de Mediadores Pró-inflamatórios na Neurodegeneração</i> | 42 |
| 2.9 | Indução da Doença de Parkinson por Neurotoxinas como Modelo de Estudo | 43 |
| 2.10 | Algas Marinhas: Perspectivas como Agentes Neuroprotetores | 45 |
| 3 | CAPÍTULO I – EFEITO DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DE ALGAS MARINHAS VERMELHAS EM MOCELO IN VITRO DE NEUROINFLAMAÇÃO INDUZIDA POR AMINOCROMO | 47 |
| 4 | OBJETIVOS | 48 |
| 4.1 | Geral | 48 |
| 4.2 | Específicos | 48 |
| 5 | METODOLOGIA | 48 |
| 5.1 | Coleta de Espécimes das Macroalgas Marinhas | 48 |
| 5.2 | Extração dos Polissacarídeos Sulfatados Totais (PST) | 49 |
| 5.2.1 | <i>Análise de Rendimento</i> | 51 |

| | | |
|--------|--|-----|
| 5.3 | Caracterização Físico-química e Estrutural | 51 |
| 5.3.1 | <i>Determinação do Teor de Carboidratos Totais</i> | 51 |
| 5.3.2 | <i>Quantificação de Sulfato Livre</i> | 51 |
| 5.3.3 | <i>Determinação de Contaminantes Proteicos</i> | 51 |
| 5.3.4 | <i>Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)</i> | 52 |
| 5.3.5 | <i>Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)</i> | 52 |
| 5.3.6 | <i>Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)</i> | 52 |
| 5.4 | Cultura Primária de Células Gliais | 52 |
| 5.5 | Síntese do Aminocromo | 53 |
| 5.6 | Protocolo Experimental | 53 |
| 5.7 | Teste de Viabilidade Celular | 53 |
| 5.7.1 | <i>Teste do MTT</i> | 53 |
| 5.7.2 | <i>Teste de Exclusão do Azul de Tripán</i> | 54 |
| 5.8 | Determinação dos Níveis de Nitrito/Nitrato | 55 |
| 5.9 | Western blot | 55 |
| 5.10 | Morfologia Celular e Imunocitoquímica | 56 |
| 5.10.1 | <i>Ensaio de Proliferação Celular</i> | 57 |
| 5.11 | Determinação da Expressão do RNAm através de qRT-PCR | 57 |
| 6 | ANÁLISE ESTATÍSTICA | 59 |
| 7 | ARTIGO 1 – STRUCTURAL ANALYSIS OF κ-CARRAGEENAN FROM <i>Hypnea pseudomusciformis</i> AND PROTECTIVE EFFECT AGAINST AMINOCHROME-INDUCED NEUROINFLAMMATION | 60 |
| 8 | ARTIGO 2 - SULFATED AGARAN FROM THE SEAWEEDS OF THE GENUS GRACILARIA: NEUROINFLAMMATION INHIBITORY POTENTIAL UNDER AMINOCHROME-STIMULATED IN GLIAL CELLS | 86 |
| 9 | CAPÍTULO II - ANÁLISE COMPARATIVA DE AGARANAS SULFATADAS DO GÊNERO GRACILARIA EM MODELO IN VIVO DE DOENÇA DE PARKINSON INDUZIDO POR 6-OHDA EM RATOS | 113 |
| 10 | OBJETIVOS | 114 |
| 10.1 | Geral | 114 |
| 10.2 | Específicos | 114 |

| | | |
|---------------|---|-----|
| 11 | METODOLOGIA | 114 |
| 11.1 | Coleta de Espécimes das Macroalgas Marinhas | 114 |
| 11.2 | Extração dos Polissacarídeos Sulfatados Totais (PST) | 114 |
| 11.3 | Animais | 114 |
| <i>11.3.1</i> | <i>Aspectos Éticos</i> | 115 |
| 11.4 | Design Experimental | 115 |
| 11.5 | Cirurgia Estereotáxica | 116 |
| 11.6 | Protocolo Experimental | 117 |
| 11.7 | Avaliação da Atividade Locomotora | 117 |
| <i>11.7.1</i> | <i>Teste do Campo Aberto</i> | 117 |
| 11.8 | Teste do Cilindro | 118 |
| 11.9 | Teste Rotacional Induzido por Apomorfina | 119 |
| 12 | ANÁLISES NEUROQUÍMICAS | 120 |
| 12.1 | Determinação da Concentração de Nitrito/Nitrato | 120 |
| 12.2 | Determinação da Peroxidação Lipídica (TBARS) | 120 |
| 12.3 | Determinação da Concentração de Glutathiona Reduzida | 121 |
| 12.4 | IMUNO-HISTOQUÍMICA | 122 |
| 12.5 | DETERMINAÇÃO DA EXPRESSÃO DO RNAm ATRAVÉS DE PCR QUANTOTATIVA EM TEMPO REAL (qRT-PCR) | 123 |
| <i>12.5.1</i> | <i>Extração de RNA e Síntese de cDNA</i> | 123 |
| <i>12.5.2</i> | <i>PCR Quantitativa em Tempo Real (qRT-PCR)</i> | 123 |
| 12.6 | ANÁLISE ESTATÍSTICA | 124 |
| 13 | ARTIGO 3 - SULFATED POLYSACCHARIDES FROM THE RED SEAWEEDS OF THE GRACILARIA GENUS PROTECTS AGAINST 6-OHDA-INDUCED RAT NEURONAL DAMAGE AND INHIBITS THE PRODUCTION OF PROINFLAMMATORY MEDIATORS | 125 |
| 14 | CONCLUSÃO | 150 |
| | REFERÊNCIAS | 151 |

| | |
|--|------------|
| ANEXO A – CERTIDÃO DO CADASTRO DAS ALGAS MARINHAS NO SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO (SISGen) | 161 |
| ANEXO B – SUBMISSÃO À REVISTA CARBOHYDRATE POLYMERS | 162 |
| ANEXO C – PUBLICAÇÃO NA JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES | 163 |