

Avaliação dos efeitos anticonvulsivos do resveratrol para tratamento de espasmos epiléticos de crianças com microcefalia

Helena Vieira Fernandes, Júlia Alves de Jesus, Thauany Micaelly Araújo Galvão (orientadora), Vinícius Ribeiro de Moraes (coorientador) | CEFET/RJ - Campus Maracanã | Escola Eleva| UFRJ - Universidade Federal do Rio de Janeiro

Introdução

A partir de outubro de 2015, houve um aumento inesperado no número de bebês nascidos com microcefalia, malformação congênita caracterizada pelo perímetro cefálico reduzido para a idade gestacional e alterações no sistema nervoso central, associada ao vírus da Zika. Entre as repercussões neurológicas de crianças com microcefalia associada ao vírus da Zika estão as convulsões, que são causadas pelo aumento aberrante das descargas neuronais, podendo ser classificadas como quadro de epilepsia quando ocorridas em série.

Infelizmente, os remédios atualmente oferecidos no mercado para tratar esses espasmos epiléticos de crianças com microcefalia apresentam uma série de problemas: eles são inacessíveis financeiramente, difíceis de se obter através do SUS em zonas periféricas do país, apresentam dificuldades de punção venosa periférica em crianças pequenas sendo incapazes de tratar os eventos convulsivos de forma imediata, e apresentam uma série de efeitos colaterais.

Diante do exposto, o resveratrol, um polifenol encontrado na casca e semente da uva, pode ser um promissor tratamento alternativo para os espasmos epiléticos de crianças com microcefalia por apresentar propriedades neuroprotetoras. O composto seria uma intervenção terapêutica mais acessível para a população de baixa renda e periférica, trataria imediatamente as crises convulsivas em crianças pequenas por infusão em bolus, e não apresentaria efeitos colaterais.

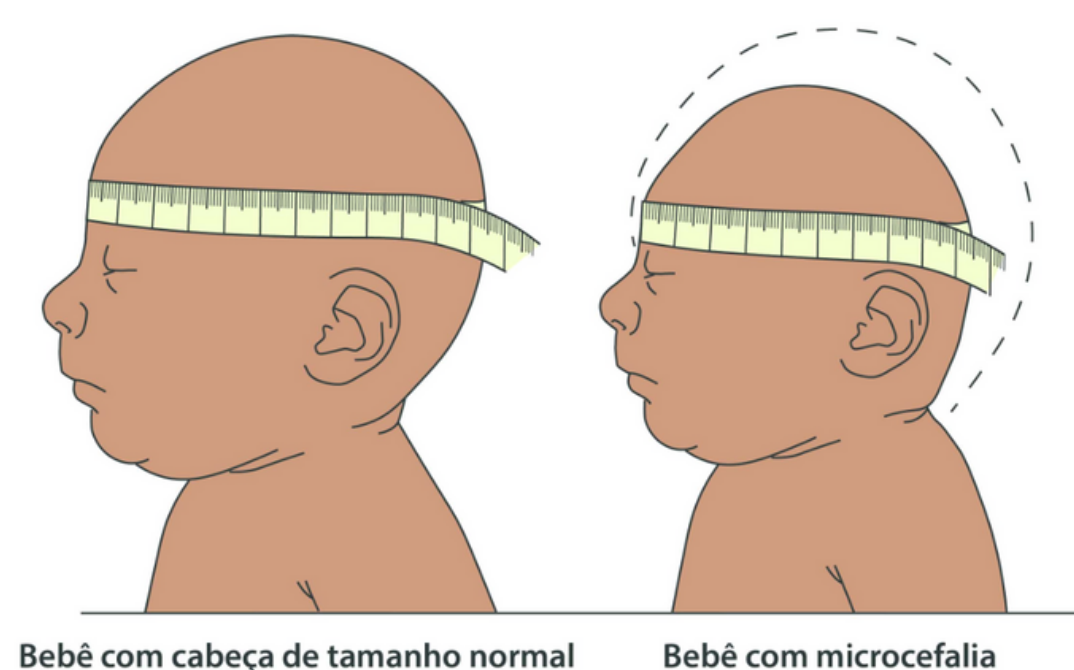


Figura 1: Comparação de bebês com cabeça de tamanho normal e bebês com microcefalia. Fonte: <https://lms.hcdeciui.com.br/portal/zika/atencao-especializada/planejamento-assistencial-criancas-expostas-ao-zika/>

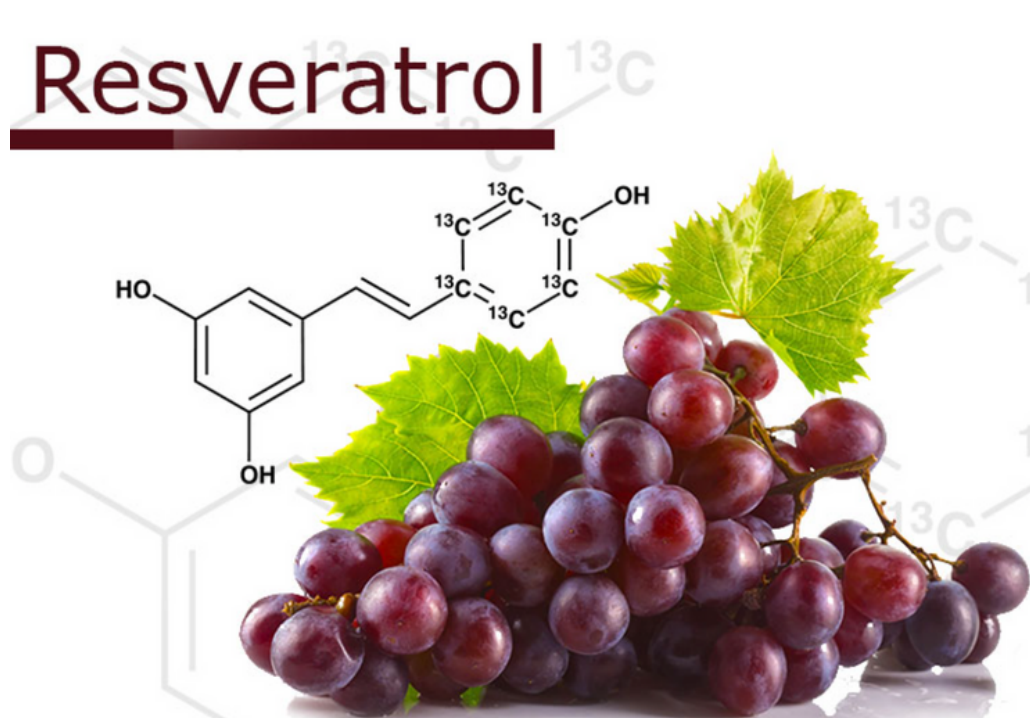


Figura 2: Resveratrol em estrutura molecular. Fonte: <https://jrcgolding.co.za/what-is-resveratrol-how-can-it-benefit-your-health/>

Questão problema

É possível produzir um tratamento alternativo, de baixo custo e por infusão *in bolus* para tratar espasmos epiléticos de bebês e crianças com microcefalia utilizando o composto natural resveratrol em sua versão micronizada?

Objetivo geral

Avaliar o efeito anticonvulsivo do trans-resveratrol (incluindo sua versão micronizada), comparando-o com o de medicamentos anticonvulsivantes já no mercado e elaborando um medicamento acessível substituto através do resveratrol.

Objetivos específicos

- Ampliar o acesso ao tratamento das convulsões relacionadas à microcefalia por parte da sociedade que sofre com este problema ao baratear a solução;
- Possibilitar o tratamento imediato das crises convulsivas de crianças pequenas com microcefalia através da criação de um tratamento por infusão em bolus.

Métodos

A pesquisa foi dividida em três fases:

- Etapas de preparação da solução no Laboratório de Análises Avançadas em Bioquímica e Biologia Molecular (LAABBM) da UFRJ:
 - Extração do resveratrol: Uvas *Vitis labrusca*, mais especificamente uvas Isabel, por apresentarem maior concentração de resveratrol e disponibilidade regional foram escolhidas. Para a extração do resveratrol, as uvas serão misturadas com água destilada em um processador, liofilizadas, e extraídas usando uma solução etanol-água (80:20, v/v) em um agitador térmico. O extrato será filtrado através de um coador de aço inoxidável e concentrado para 10ml por evaporação rotativa (in vácuo) à temperatura ambiente. Para conclusão desta parte da metodologia, os extratos concentrados serão filtrados através de membrana de 0,22µm e injetados no cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) sem processamento adicional;
 - Micronização do resveratrol: Considerando que o resveratrol apresenta baixa biodisponibilidade, fez-se necessário micronizá-lo para aumentar a eficácia da substância. Para isso, o resveratrol já extraído passará por um processo de coprecipitação para ser micronizado. A coprecipitação do resveratrol será realizada usando SEDS (dispersão da solução por fluidos supercríticos) e as condições de micronização são: concentração de soluto de 20mg/ml, temperatura de 35°C, vazão da solução 1ml/min, vazão de antissolvente de 20mg/ml mantida a 20MPa e 5°C e pressão de operação 8MPa.

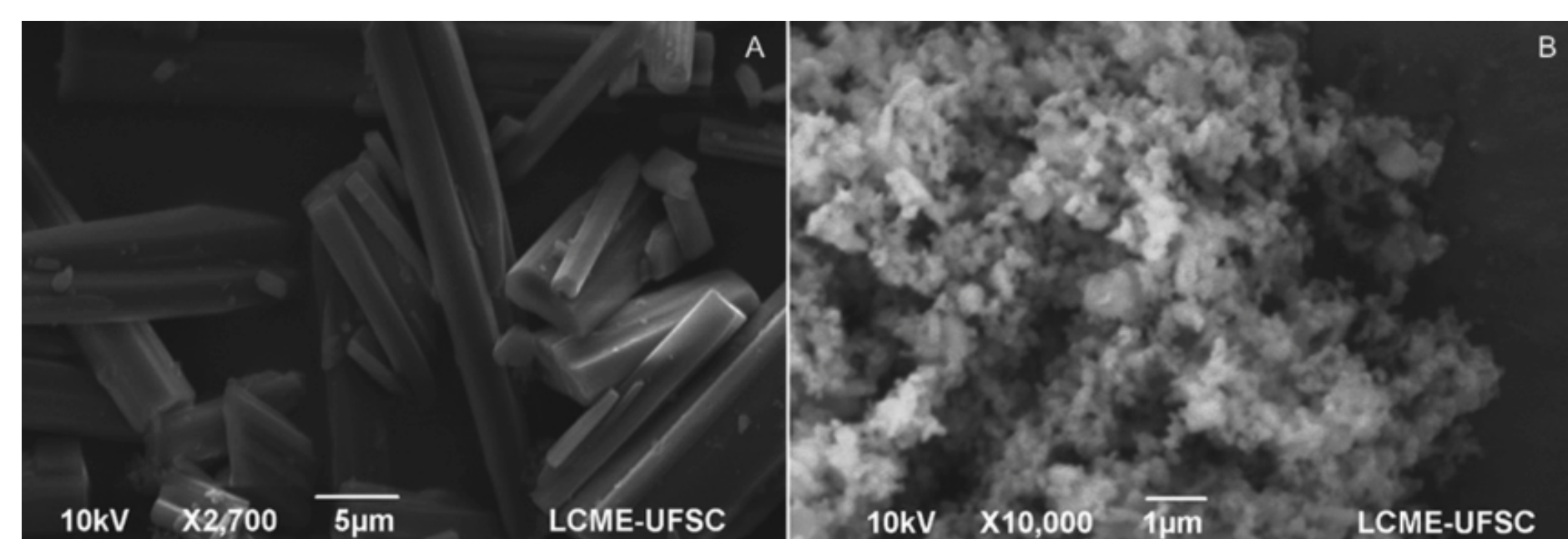


Figura 3: Microscopia Eletrônica de Varredura do resveratrol (A) e de sua versão micronizada (B). Fonte: DECUJ et al., 2020, p. 3. Disponível em: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S09201211193045897>

- Teste *in-vivo* no Laboratório de Doenças Neurodegenerativas (LDN) na UFRJ:
 - Pré-tratamento com diazepam, trans-resveratrol e trans-resveratrol micronizado: Para os testes *in-vivo*, o peixe-zebra foi escolhido como animal de teste pois já há estudos utilizando estes animais para análise dos efeitos promissores do resveratrol micronizado. Ao longo do tratamento, os peixes-zebras serão expostos ao diazepam, trans-resveratrol e trans-resveratrol micronizado 30 minutos antes da exposição ao PTZ. O diazepam será utilizado como controle positivo. As concentrações de resveratrol e diazepam foram selecionadas com base em estudos preliminares realizados. As larvas de peixe-zebra (n = 18/grupo) serão colocadas individualmente em placas de 6 poços (1 larva/poço com 5000µL de solução) e submetidas a solução salina (0,9% NaCl), resveratrol a 1µM, resveratrol micronizado a 1µM ou diazepam a 75µM por 30 min. Os peixes serão alocados aleatoriamente em grupos experimentais usando um número aleatório computadorizado;

- Indução de convulsão com PTZ: Para induzir convulsões, as larvas serão individualmente expostas à solução de PTZ (3 mM, aplicada no meio larval) em placas de 6 poços. Para verificação da exposição das larvas ao PTZ, elas serão filmadas e avaliadas posteriormente por observadores treinados. Quanto ao estudo do comportamento e tipo convulsivo, estes serão classificados de acordo com cada estágio: estágio I (atividade de natação dramaticamente aumentada), estágio II (comportamento de natação em redemoinho) III (convulsão tipo clônus seguida de perda de postura, quando o animal cai para o lado e permanece imóvel por 1-3s). Os animais serão submetidos ao PTZ até atingirem o estágio III, que corresponde ao estágio de convulsão tônico-clônico do peixe-zebra, ou até 600s. Ao final da análise, a ocorrência de cada estágio de crise e a latência para o primeiro sinal comportamental de cada estágio de crise serão verificadas. Os investigadores estarão cegos para os grupos experimentais.

PTZ-induced seizure model in zebrafish larvae.



Tabela 1: Diâmetro das partículas de resveratrol e sua versão micronizada. Fonte: Tabela produzida pelas autoras com base em DECUJ et al., 2020, p. 3. Disponível em: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S09201211193045897>

- Análise de dados: Quanto à análise de dados, a normalidade dos dados será observada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Para visualização dos dados, estes serão expressos como a porcentagem de animais que atingirem cada estágio de convulsão. Ainda, a latência para atingir cada estágio de convulsão e os parâmetros comportamentais serão analisados por análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Tukey. Para conclusão das análises planejadas, os dados de latência e comportamentais são expressos como média ± erro padrão da média (SEM). $p < 0,05$ serão considerados estatisticamente significantes.

Resultados

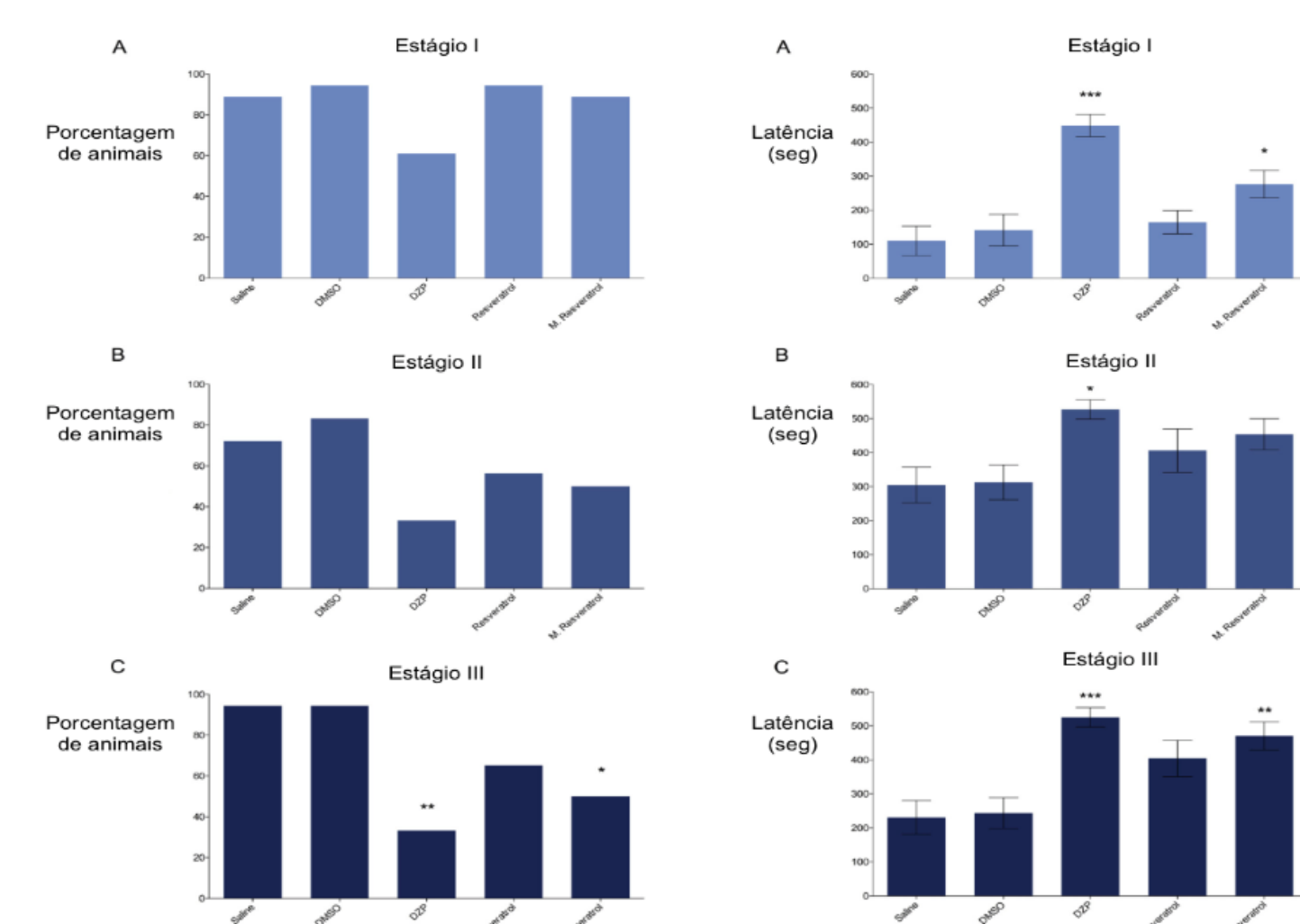
Com base no artigo "Micronized resveratrol shows promising effects in a seizure model in zebrafish and signalizes an important advance in epilepsy treatment," espera-se que os processos descritos na seção 3.2 desta pesquisa resultem na micronização do resveratrol (DECUJ et al., 2020, p.3). As alterações morfológicas das partículas e redução em diâmetro podem ser observadas, respectivamente, através da Tabela 1 abaixo.

	Diâmetro mínimo da partícula (µm)	Diâmetro máximo da partícula (µm)	Média do diâmetro da partícula (µm)	Coefficiente de variação
Resveratrol	1,71	126,09	37,67 ±21,42	0,58
Resveratrol micronizado	0,07	0,40	0,20 ±0,08	0,39

Tabela 1: Diâmetro das partículas de resveratrol e sua versão micronizada. Fonte: Tabela produzida pelas autoras com base em DECUJ et al., 2020, p. 3. Disponível em: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S09201211193045897>

Como pode ser observado através da Tabela 1, o resveratrol ao ser micronizado teve uma redução significativa no diâmetro de sua partícula de 37,67µm para 0,20µm em média.

Novamente, com base no artigo "Micronized resveratrol shows promising effects in a seizure model in zebrafish and signalizes an important advance in epilepsy treatment," espera-se que os processos descritos na seção de métodos revelem os efeitos anticonvulsivos das substâncias administradas no artigo citado acima, e mais especificamente, o potencial do uso do resveratrol e sua versão micronizada para tratamento de epilepsia. Nas figuras abaixo essas substâncias aparecem na seguinte ordem: solução salina (saline), dimetil sulfoxido (DMSO), diazepam (DZP), resveratrol (Resveratrol), resveratrol micronizado (M. Resveratrol). Além disso, a porcentagem de animais tratados por cada substância que atingiram cada estágio de convulsão pode ser observada pela Figura 2 abaixo. Em especial, as latências em segundos para atingir cada estado de convulsão para cada grupo pode ser analisada através da Figura 3 abaixo.



Figuras 2 e 3: Porcentagem de animais tratados por cada substância que atingiram cada estágio de convulsão (2). Latência (seg) para atingir cada estágio de convulsão por substância administrada (3). Fonte: Adaptada de DECUJ et al., 2020, p. 3. Disponível em: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S09201211193045897>

Conclusão

Entende-se, portanto, que há a necessidade do aproveitamento das possibilidades de aplicações farmacêuticas do trans-resveratrol para a redução dos impactos dos eventos convulsivos em crianças e bebês com microcefalia, já que não existem discussões atuais no Brasil sobre utilização do composto neste cenário específico.

Esta pesquisa procura iniciar a experimentação *in-vivo* em parceria com o Laboratório de Doenças Neurodegenerativas (LDN) da UFRJ e Laboratório de Análises Avançadas em Bioquímica e Biologia Molecular (LAABBM) da UFRJ. Espera-se observar as propriedades neuroprotetoras e anticonvulsivas presentes no trans-resveratrol (Polygonum cuspidatum), visando criar por fim um medicamento por infusão em bolus. Desta forma, será possível reduzir a dependência de medicamentos tradicionais, que são inacessíveis para a população geral, tratar imediatamente crises convulsivas de crianças pequenas, além de combater os efeitos adversos para a saúde de seus usuários, oferecendo uma maior qualidade de vida e bem-estar.

Finalmente, a atual pesquisa busca alternativas farmacêuticas para o tratamento das crises convulsivas em decorrência do quadro de microcefalia através da utilização do composto natural antioxidante e anti-inflamatório de baixo-custo resveratrol, trazendo importante aplicação científica para tratamento de epilepsia em bebês e crianças com microcefalia.

Referências

- AGROLINK, D. <https://www.agrolink.com.br/foctacoes/frutas/ziva/>. Acesso em: 4 nov. 2022.
- AQUIAR, G. MICRONIZAÇÃO DE N-ACETILCISTEÍNA E TRANS-RESVERATROL PELA TÉCNICA SEDS E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS IN VITRO E IN VIVO. (s.l.: s.n.). Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/jmiu/bitstream/handle/123456789/181248/348717.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
- BARABAN, S. C. et al. Pentylentetrazole induced changes in zebrafish behavior, neural activity and c-fos expression. *Neuroscience*, v. 131, n. 3, p. 759-768, 2005.
- BODDY, A. V. et al. Comparison of continuous infusion and bolus administration of fosphenytoin in children. *European Journal of Cancer*, v. 31, n. 5, p. 785-790, Jan. 1995.
- COLLUCCI, C. Na falta de remédio para epilepsia, Ministério da Saúde propõe reduzir dosagem. Disponível em: <https://www1.folha.uol.com.br/epilepsia/ministerio-da-saude-propoe-reduzir-dosagem.shtml>. Acesso em: 4 nov. 2022.
- DECUJ, L. et al. Micronized resveratrol shows promising effects in a seizure model in zebrafish and signalizes an important advance in epilepsy treatment. *Epilepsy Research*, v. 159, p. 2-4, Jun. 2020.
- DRE, S. Unique Properties of Polyphenol Compounds in the Brain: More than Direct Antioxidant Actions; *Gene/Protein Regulatory Activity*. *Neurosignals*, v. 14, n. 1-2, p. 61-70, 2005.
- DROGARIA SÃO PAULO. Sabri 500mg 60 Comprimidos Revestidos - Drogaria Sao Paulo. Disponível em: <https://www.drogariasapaulo.com.br/sabri-500mg-60-comprimidos-revestidos/p>. Acesso em: 4 nov. 2022.
- FAPERJ. Cultivo de uvas garfã forja no interior fluminense. Disponível em: <https://bit.ly/3gqjz5s>. Acesso em: 5 nov. 2022.
- FLÁVIA, T. et al. EL PEZ ZEBRA COMO MODELO EXPERIMENTAL PARA EL ESTUDIO DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE. *Biotecnologia Via Científica*. Disponível em: <https://doi.org/10.15445/biotecnologia.v11n1.p1>, 2018.
- GARCIA, L. EPIDEMIA DO VÍRUS ZIKA E MICROCEFALIA NO BRASIL: EMERGÊNCIA, EVOLUÇÃO E ENFRENTAMENTO. (s.l.: s.n.). Disponível em: https://repositorio.ipea.gov.br/bitstream/11058/8282/1/td_2368.pdf.
- KING, R. E.; BOMSER, J. A.; MIN, D. B. Bioactivity of Resveratrol. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 5, n. 3, p. 65-70, Jul. 2006.
- LEKLI, I.; RAY, D.; DAS, D. K. Longevity nutrients resveratrol, sines and grapes. *Genes & Nutrition*, v. 5, n. 1, p. 55, 4 set. 2009.
- LÜ, H. et al. Role of Ca²⁺/Calmodulin-dependent Protein Kinase II in Drosophila Photoreceptors. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 284, n. 17, 24 abr. 2009.
- MARTINS, R. Avaliação in silico da interação entre o receptor GABA_A e metalocompostos derivados de benzodiazepínicos. *www.arca.fiocruz.br*, 2019.
- MUSSULINI, S. UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA. (s.l.: s.n.). Disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/87580/00091117X.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 4 nov. 2022.
- PEREIRA, L. P. et al. Crises convulsivas em neonatos com microcefalia associada à infecção pelo Zika vírus (Seizures in newborn with microcephaly associated to Zika virus infection) [Crises convulsivas em neonatos com microcefalia associada à infecção por vírus de Zika]. *Revista Enfermagem UERJ*, v. 27, p. 2, 19 dez. 2019.
- PORTIELLA, J.; PIVA, D. Midazolam versus diazepam para tratamento de estado de mal epilético em emergência pediátrica: Midazolam versus diazepam for the treatment of status epilepticus in pediatric emergency. *Emergência* *Emergência* *Emergência*. Disponível em: https://repositorio.ufrj.br/bitstream/11058/8282/1/td_2368.pdf.
- TERRA, A. UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS EFEITOS DOS ANTICONVULSIVANTES NA APRENDIZAGEM. (s.l.: s.n.). Disponível em: https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/BUBD-9HCN8V/1/monografia_final.pdf.
- TODALDO, I. Isabela Maas Trassold POTENCIAL BIOTATIVO DE SUCOS DE UVA VITIS LABRUSCA L.: CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, INFLUÊNCIA DE SEMENTES DE UVA E DE PECTINASES NA COMPOSIÇÃO FENOLICA, E BIOTATIVIDADE DO TRANS-RESVERATROL EM CELULAS HUMANAS. (s.l.: s.n.). Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/jmiu/bitstream/handle/123456789/17894/039575.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 4 nov. 2022.
- WALLE, T. et al. HIGH ABSORPTION BUT VERY LOW BIOAVAILABILITY OF ORAL RESVERATROL IN HUMANS. *Drug Metabolism and Disposition*, v. 32, n. 12, p. 1377-1382, 27 ago. 2004.
- WALLE, T. Bioavailability of resveratrol. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1215, n. 1, p. 9-15, Jan. 2011.
- WENZEL, E.; SOMMOZA, V. Metabolism and bioavailability of trans-resveratrol. *Molecular Nutrition & Food Research*, v. 49, n. 5, p. 472-481, maio 2005.