

Análise de nanopartículas contendo alfa-humuleno na neuroinflamação através de indução de acidente vascular cerebral em modelo animal

Analysis of nanoparticles containing alpha-humulene in neuroinflammation through induction of stroke in animal model

Análisis de nanopartículas conteniendo alfa-humuleno en la neuroinflamación a través de inducción de accidente vascular cerebral en modelo animal

Bruna Aparecida Metinoski Bueno¹, Ivo Ilvan Kerppers²

1.Fisioterapeuta, UNICENTRO. Guarapuava-PR, Brasil.

2.Fisioterapeuta, Doutor em engenharia biomédica, UNICENTRO. Guarapuava-PR, Brasil.

Resumo

Introdução. O Acidente vascular cerebral (AVC) é considerado a segunda causa de morte no mundo e a terceira causa de incapacidade. Alguns fitoquímicos mostram potencial neuroprotetor em pesquisas pré-clínicas através de mecanismos como pela ação anti-inflamatória como o composto α -humuleno (HUM), no qual os sistemas de liberação de fármacos como as nanopartículas demonstram mais eficácia para passar pela barreira hematoencefálica no tratamento de distúrbios neurológicos. A droga Sinvastatina (SNT), utilizada na prevenção de AVC é estudada como possível neuroprotetor no AVC isquêmico.

Objetivo. Investigar os efeitos de nanopartículas contendo α -humuleno (NA) na lesão isquêmica cerebral induzida por convulsão por eletrochoque em ratos e analisar a recuperação funcional após lesão isquêmica através de testes motores e comparar com os efeitos do uso da droga sinvastatina. **Método.** A amostra foi composta de 30 ratos *Wistar*, separados em três grupos: grupo controle, tratados com NA e o grupo tratados com SNT. Os testes avaliaram a capacidade funcional e motora, aprendizado e memória. **Resultados.** Houve diferença significativa entre os grupos. O tratamento com o NA apresentou melhores achados comparados ao grupo SNT e o grupo controle, tanto na recuperação da capacidade funcional e motora nos testes de apreensão e suspensão ($p < 0,001$), como na capacidade de aprendizado e memória pelo teste do LAM ($p < 0,001$). **Conclusão.** O potencial anti-inflamatório da administração oral de NA na neuroinflamação demonstrou melhorias, no qual a SNT teve menores achados.

Unitermos. Acidente vascular cerebral isquêmico; Alfa-humuleno; Nanopartículas

Abstract

Introduction. Stroke is considered the second leading cause of death worldwide and the third leading cause of disability. Some phytochemicals show neuroprotective potential in preclinical research through mechanisms such as anti-inflammatory action, including the compound α -humulene (HUM). Drug delivery systems like nanoparticles have shown greater efficacy in crossing the blood-brain barrier for the treatment of neurological disorders. The drug Simvastatin (SNT), used in stroke prevention, is studied as a potential neuroprotector in ischemic stroke. **Objective.** To investigate the effects of α -humulene-containing nanoparticles (NA) on ischemic brain injury induced by electroshock seizures in rats and to analyze functional recovery after ischemic injury through motor tests and compare with the effects of simvastatin.

Method. The sample consisted of 30 Wistar rats, divided into three groups: control group, the group treated with NA, and the group treated with SNT. The tests evaluated functional and

motor capacity, learning, and memory. **Results.** There was significant difference among the groups. The NA treatment showed better results compared to the SNT group and the control group, both in functional and motor recovery in the grasp and suspension tests ($p < 0.001$) and in learning and memory capacity measured by the LAM test ($p < 0.001$). **Conclusion.** The anti-inflammatory potential of oral NA administration in neuroinflammation demonstrated improvements, whereas SNT showed lower results.

Keywords. Ischemic stroke; Alpha Humulene; Nanoparticles

Resumen

Introducción. El accidente vascular cerebral (AVC) se considera la segunda causa de muerte en el mundo y la tercera causa de incapacidad. Algunos fitoquímicos muestran un potencial neuroprotector en investigaciones preclínicas a través de mecanismos como la acción antiinflamatoria, como el compuesto α -humuleno (HUM), en el cual los sistemas de liberación de fármacos como las nanopartículas demuestran mayor eficacia para atravesar la barrera hematoencefálica en el tratamiento de trastornos neurológicos. El fármaco Sinvastatina (SNT), utilizado en la prevención de AVC, se estudia como posible neuroprotector en el AVC isquémico.

Objetivo. Investigar los efectos de nanopartículas que contienen α -humuleno (NA) en la lesión isquémica cerebral inducida por convulsión por electrochoque en ratas y analizar la recuperación funcional después de la lesión isquémica a través de pruebas motoras y comparar con los efectos del uso del fármaco sinvastatina. **Método.** Hubo una diferencia significativa entre los grupos. La muestra estuvo compuesta por 30 ratas Wistar, separadas en tres grupos: el grupo control, el grupo tratado con NA y el grupo tratado con SNT. Las pruebas evaluaron la capacidad funcional y motora, el aprendizaje y la memoria. **Resultados.** Hubo una diferencia significativa entre los grupos. El tratamiento con NA presentó mejores hallazgos comparados con el grupo SNT y el grupo control, tanto en la recuperación de la capacidad funcional y motora en las pruebas de captura y suspensión ($p < 0,001$), como en la capacidad de aprendizaje y memoria mediante la prueba de LAM ($p < 0,001$). **Conclusión.** El potencial antiinflamatorio de la administración oral de NA en la neuroinflamación demostró mejoras, mientras que la SNT mostró resultados inferiores.

Palabras clave. Accidente vascular cerebral isquémico; Alfa-humuleno; Nanopartículas

Trabalho realizado na Instituição Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO). Guarapuava-PR, Brasil.

Conflito de interesse: não

Recebido em: 01/08/2024

Aceito em: 18/09/2024

Endereço para correspondência: Bruna AM Bueno. Rua Emiliano Perneta 220. Alto da XV. Guarapuava-PR, Brasil. Email: bruna_metinoski@hotmail.com

INTRODUÇÃO

Quando o suprimento de sangue é interrompido ou reduzido para o tecido cerebral ocorre o AVC, sendo que o isquêmico tem origem pela oclusão das artérias cerebrais por embolia ou trombos e é mais comum, sendo responsável por 80% dos casos¹. De acordo com a gravidade da diminuição do fluxo sanguíneo na área específica do cérebro, a área isquêmica pode ser classificada como núcleo do infarto e penumbra isquêmica. No núcleo do infarto ocorre rápida na morte celular. A área da penumbra isquêmica a redução do

fluxo sanguíneo é menos grave, por causa da perfusão de vasos sanguíneos colaterais. No cérebro isquêmico, os mecanismos de morte celular envolvidos estão o desequilíbrio iônico e excitotoxicidade, estresse oxidativo/nitrosativo e a inflamação².

Sistemas de liberação de fármacos, como as nanopartículas poliméricas apresentam propriedades com grande potencial para o transporte efetivo de drogas de maneira não invasiva³. A intervenção com neuroprotetores tem como objetivo preservar, recuperar e/ou regenerar o sistema nervoso, interferindo positivamente na sequência de danos causado pela isquemia⁴. O α -humuleno é um sesquiterpeno monocíclico tem apresentado diversas propriedades farmacológicas, alguns estudos têm demonstrado o potencial anti-inflamatório do α -humuleno através da inibição de diversos mediadores inflamatórios⁵.

Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi investigar os efeitos de nanopartículas contendo α -humuleno na recuperação funcional após lesão isquêmica e comparar com os efeitos do uso da droga sinvastatina.

MÉTODO

Amostra

Composta por 30 animais machos, da raça *Rattus Norvegicus*, linhagem *Wistar*, pesando entre 200-250 gramas, que foram comprados do Biotério da Universidade Estadual de Londrina e Maringá após a aprovação pelo comitê de ética no uso de animais.

O guia institucional e nacional para o cuidado e uso dos animais no laboratório foi seguido. O projeto experimental do presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Universidade Estadual do Centro-Oeste, sob o número de protocolo 010/2022.

Procedimento

Formulação e caracterização de nanopartículas de alfa-humuleno

As nanopartículas foram produzidas pelo laboratório de nanotecnologia da Universidade Estadual do Centro-Oeste – UNICENTRO.

Preparação de nanopartículas

Essas foram obtidas pelo método de precipitação anti-solvente, de acordo com a metodologia descrita nos estudos anteriores⁶ com modificações. Ocorrendo a coacervação complexa entre a nanopartícula de Zeína e a Quitosana. Primeiramente o solvente original foi preparado dissolvendo Zeína em etanol (87% v/v) com agitação (600rpm) à temperatura ambiente (25°C) durante 3h para obter um líquido transparente (20mg/mL). Após a Quitosana foi suspensa em ácido acético (1% p/v) para fazer uma solução estoque anti-solvente. Em seguida, a quantidade de anti-solvente (solução de Qs 1% p/v de ácido acético) foi dissolvida em uma quantidade de solvente original (20mg/mL de solução de Zeína, 87% v/v etanol) rapidamente sob agitação (1500rpm) durante um minuto.

Em detalhe, a razão volumétrica de Zeína para Qs também foi controlada (1:3, 1:6 e 1:9) de acordo com as variáveis onde teremos os volumes de acordo com o planejamento fatorial (1:3 [2,5mL:7,5mL], 1:6 [1,250 mL:8,75mL], 1:9 [1mL: 9mL]).

Em segundo lugar, a suspensão foi colocada no SpeedVac a 1300rpm/50°C durante 1h para evaporar o etanol. Após evaporação, as suspensões obtidas foram centrifugadas a 3000g (5000rpm)/15°C durante 20 minutos e o sobrenadante foi armazenado para posterior análises.

Diâmetro médio e distribuição de tamanho

O diâmetro médio e o índice de polidispersão (PDI) das nanopartículas foram determinados pela técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS) (BIC 90 Plus, Brookhaven Instruments Corp., Holtsville, NY). As nanopartículas foram dispersas em água ultrapura (1:200v/v) e colocadas em uma cubeta para análise. Todas as medições foram realizadas com um ângulo de espalhamento de 90° a 25°C e um comprimento de onda do laser de 659nm.

Zeta potencial

O potencial zeta foi determinado a partir da mobilidade eletroforética das nanopartículas suspensas. As amostras foram diluídas (1:200v/v) em solução de 1mM de KCl e colocadas em uma célula eletroforética a 25°C sob o potencial de ± 150 mV (ZetaSizer ZS, Malvern, UK).

Determinação da eficiência de encapsulamento (EE)

Para determinar a quantidade de α -Humuleno encapsulado em nanopartículas, foi aplicada uma análise indireta. Uma alíquota do sobrenadante resultante da ultracentrifugação das nanopartículas foi diluída em fase móvel, filtrada em membrana de 0,22 μ m e analisada por HPLC (Waters 2695-Alliance, Milford, EUA). A análise foi realizada em triplicata. A fase móvel era composta por metanol, tampão fosfato pH6,8 e acetonitrila (63:30:7, v/v/v) com vazão de 0,9mL/min. O detector de PDA foi ajustado para 306nm.

Grupo experimental

Os animais foram divididos em três grupos:

- Grupo controle Positivo: 10 animais com indução de convulsão por estimulador de corrente, sem tratamento.
- Grupo tratado com nanopartículas de α -Humuleno: 10 animais com indução de convulsão por estimulador de corrente e tratados com 6 μ g de nanopartículas de α -Humuleno dissolvido em salina 0,9%, por gavagem a cada 24 horas.
- Grupo tratado com Sinvastatina: 10 animais com indução de convulsão por estimulador de corrente e tratados com 6 μ g de sinvastatina dissolvido em salina 0,9%, por gavagem a cada 24 horas.

Local do estudo

Os procedimentos foram realizados no Laboratório de Neuroanatomia e Neurofisiologia da UNICENTRO, Guarapuava-PR, onde foram mantidos os animais, separados em grupos e alocados cinco animais por gaiola. Os animais tiveram livre acesso a água e comida, permanecendo em jejum oito horas antes da cirurgia e com restrição de água quatro horas antes da cirurgia. Seguindo o ciclo claro/escuro de 12 horas com temperatura ambiente de $23\pm 1^{\circ}\text{C}$.

Protocolo dos Procedimentos Cirúrgicos

Todos passaram por cirurgia estereotáxica para implante de eletrodo, constituído por fio de cobre de 10mm de comprimento. O local do implante foi determinado a partir das coordenadas estereotáxicas: Antero-posterior (AP), médio-lateral (ML) e dorso-ventral (DV), sendo: AP=0,72 mm, ML=-2,4mm e DV=5,8mm, obtidas com o atlas de Paxinos e Watson⁷, tomando-se o bregma como referência, estando as suturas lambdoide e bregmática no mesmo plano horizontal, a fim de causar lesão no braço anterior da cápsula interna do cérebro do animal.

Os animais sofreram anestesia intra-abdominal com solução na proporção de 80mg/kg de Cloridrato de Cetamina (frasco de 10ml) para 15mg/kg de Cloridrato de Xilazina (frasco de 10ml) e levados a um aparelho estereotáxico (modelo David Kopf, EUA), com suas cabeças ficaram fixadas pelo conduto auditivo externo e incisivos superiores. Foi

recortado parte do tecido sobrejacente ao crânio deixando a calota craniana exposta e limpa com água oxigenada a 2%, desta forma o bregma foi localizado como ponto de referência. Em seguida, o crânio foi perfurado com uma broca odontológica de 2mm a fim de implantar o eletrodo na calvária óssea com finalidade de atingir a cápsula interna.

Depois de implantados, os eletrodos foram fixados na calvária por uma prótese de acrílico autopolimerizável, utilizando o Kit Resina Acrílica *VIPIFLASH* Autopolimerizável®. Os animais ficaram em repouso por cinco dias e após foram novamente anestesiados e receberam uma passagem de corrente elétrica do equipamento *DC POWER SUPPLY* MPS-3005 de 15mA durante cinco segundos causando o AVC isquêmico por interrupção do aporte sanguíneo e lesão neuronal.

Procedimento para utilização de analgésicos

Após o procedimento cirúrgico, os animais foram separados e receberam tramadol 2mg/kg diluído em 0,2ml de água por 12/12h por gavagem.

Critérios de inclusão

Escore neurológico: déficits neurológicos foram avaliados uma hora após a cirurgia de acordo com a escala modificada proposta por Bederson⁸. Apenas animais com isquemia, que apresentaram índice 2 e/ou 3 de gravidade foram incluídos no experimento.

Procedimentos para realização dos Testes comportamentais

Os testes realizados visaram avaliar a capacidade funcional, de aprendizagem, memória, e a capacidade motora dos animais, considerando etapas com animais saudáveis, animais com disfunções resultantes de isquemia cerebral, e animais tratados.

Teste de Apreensão

Com objetivo de avaliar a recuperação funcional do rato⁹ foi realizado o teste de apreensão, utilizando uma balança digital multiuso portátil e uma grade confeccionada de metal medindo 7x7cm, conectada à balança. O examinador manteve o animal suspenso pela cauda, sem exercer força. Os ratos são treinados para agarrar com as patas dianteiras a grade conectada à balança eletrônica tarada. A força exercida pelo animal foi registrada em gramas pela balança. O teste foi repetido três vezes com cada animal, realizando a média dos maiores valores.

Teste de Suspensão

Em ambiente iluminado, livre de ruídos e com temperatura controlada em $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$, foi realizado o teste de Suspensão, com finalidade de avaliar a coordenação motora funcional do animal e a resistência utilizando de uma barra fixada na parede e um cronômetro progressivo digital. O animal foi manualmente suspenso pelas patas dianteiras na barra, sendo cronometrado o tempo que o animal

permanecerá suspenso. O teste foi repetido 3 vezes e foi realizada média do tempo de suspensão¹⁰.

Protocolo de avaliação Campo aberto

Para análise do comportamento motor¹¹, o animal foi colocado individualmente no centro da área de teste por um período de cinco minutos, durante os quais os comportamentos foram registrados por uma filmadora e posteriormente analisados manualmente. Na análise foram avaliados o número de elevações e o congelar. O levantar considera-se apenas o apoio sobre as patas traseiras. O congelar foi considerado os momentos em que o animal permaneceu estático.

LAM

A aprendizagem espacial e a função de memória foram determinadas através de uma versão especial do labirinto aquático. O teste foi descrito por Morris¹². O experimento foi realizado em uma sala contendo uma iluminação indireta. O labirinto consiste em uma piscina circular simulada por uma caixa de água vedada e impermeabilizada na cor azul com capacidade para 1000L.

A piscina foi dividida em quatro quadrantes imaginários idênticos. Onde, 2cm abaixo da água e oculta da vista do sujeito experimental, encontra-se uma plataforma de escape de 12cm de diâmetro. A água para realização do teste estava turva e a superfície da plataforma é abrasiva para permitir que o animal suba nela assim que a detectar.

Cada animal treinou cinco vezes antes da cirurgia experimental. Sendo que em cada tentativa para encontrar o centro do labirinto o animal poderia demorar no máximo cinco minutos, e caso não o encontrasse foi indicado o caminho ao mesmo. O aspecto observado foi a latência de escape.

Memória aversiva

Os ratos foram treinados na tarefa de medo condicionado. Nesta tarefa utilizou uma câmara de treino, que consiste em uma caixa de alumínio (35x35x35cm) com um piso feito de barras paralelas de aço inoxidável espaçadas 0,8mm entre si. Esta caixa de treino situa-se dentro de uma caixa maior, acusticamente isolada para atenuar a interferência de sons externos. A pesquisa contemporânea sobre aprendizagem tem como uma de suas principais origens os estudos de Ivan Pavlov sobre as bases biológicas da aprendizagem e memória¹³.

Os animais foram inicialmente submetidos a uma sessão de treinamento individual na qual foram colocados sobre a plataforma fixa no centro da caixa de esquiva inibitória para que explore a mesma. Quando desceram da plataforma com as quatro patas sobre as barras de aço do assoalho da caixa, receberam o choque de 0,5mA por dois segundos os seguintes estímulos; som 2s; luz 5s e choque, tornando um ciclo.

Análise Estatística

Os dados obtidos da análise estatística foram dispostos em planilhas, analisados com o auxílio do software SPSS 20.0. Nas análises, o nível de significância considerado foi de $p < 0,05$. Os dados foram expressos pela média \pm erro padrão. Para as análises não paramétricas foi utilizado o teste de Friedman (ANOVA) para medições repetidas. Para realizar comparações múltiplas dos dados não paramétricos, foi utilizado o teste de *Durbin-Conover*.

RESULTADOS

Preparação das nanopartículas

Os resultados da preparação das nanopartículas foram demonstrados na Tabela 1. indicando o diâmetro médio, IP, potencial Zeta e eficiência de encapsulação.

Tabela 1. Caracterização das nanopartículas com alfa-humuleno.

Diâmetro médio (nm)	IP	Potencial Zeta (mV)	Eficiência de encapsulação (%)
210,1 \pm 3,1	0,090 \pm 0,037	+45,0 \pm 1,60	+64,0 \pm 1,93

Testes comportamentais

Os testes realizados visaram avaliar a capacidade funcional, aprendizagem, memória e a capacidade motora dos animais, considerando etapas com animais saudáveis,

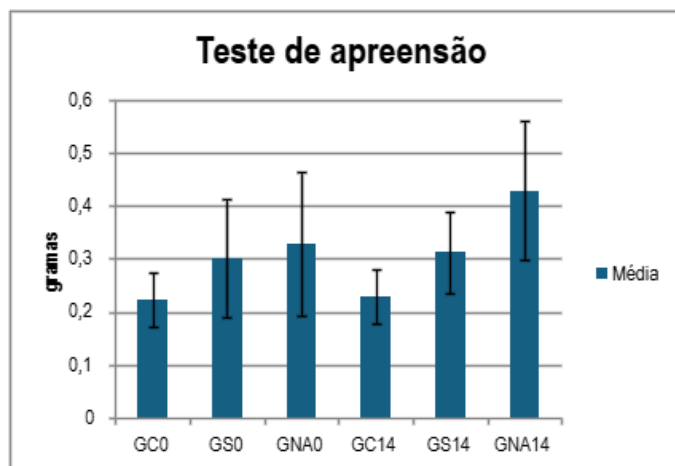
animais com disfunções resultantes de isquemia cerebral e animais tratados.

Teste de apreensão

No teste de Friedman referente ao teste de apreensão, foi encontrado o valor $p < 0,001$. Esse resultado indica a possibilidade da existência de diferenças significantes entre os grupos, sendo assim, rejeita-se a hipótese de que não houve diferenças na recuperação dos animais pelo resultado do teste de apreensão.

Na Figura 1 são demonstrados os resultados das médias e desvio padrão de cada grupo referentes ao teste de apreensão, que teve como objetivo avaliar a recuperação funcional após isquemia cerebral. Pela análise, observa-se que o GNA14 apresentou maior média no teste funcional, resultado em gramas, indicando melhores resultados e recuperação funcional.

Figura 1. Gráfico da média e desvio padrão do efeito da administração de NA e de SNT no teste de apreensão, representado em gramas.

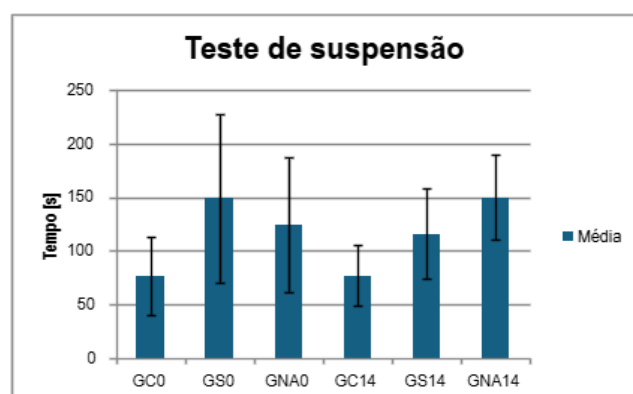


Através das comparações múltiplas entre os grupos (*Durbin-Conover*), foram encontradas diferenças significantes entre os grupos GNA0 e GNA14 ($p<,001$), indicando melhora na funcionalidade dos ratos com isquemia cerebral após o tratamento com NA. O grupo tratado com sinvastatina apresentou melhora após 14 dias, sem diferenças significantes, porém com tendência a significância ($p=0,07$). Foi encontrado resultados significantes do GNA14 e do GS14 quando comparados ao grupo tratamento controle (GC14), no qual o valor de $p<,001$ para ambos. Entretanto o tratamento com NA teve diferenças significantes ao tratamento com SNT com $p=0,007$.

Teste de suspensão

Esse teste foi utilizado com o objetivo de avaliar a força e coordenação através do registro do tempo de latência da queda da barra pelos ratos. O resultado do teste foi representado pela Figura 2, com médias e desvio padrão de cada grupo.

Figura 2. Gráfico da média e desvio padrão do efeito da administração de NA e de SNT no teste de suspensão, representado em segundos.



Através do teste de Friedman referente aos resultados da realização do teste de suspensão, foi encontrado o valor de $<0,001$. Mediante o teste *Durbin-Conover*, os grupos GNA14 e GNA0 demonstraram diferenças significantes com $p=0,010$, indicando que ocorreu aumento no tempo que os ratos conseguiram manter em suspensão. O GS14 evidenciou diminuição da média do tempo de suspensão quando comparado ao GS0 ($p=0,06$), resultados com tendência a significância.

O grupo tratado com NA exibiu resultados significantes quando comparado ao GC14, com valor de $p<0,001$. Dessa forma, os resultados encontrados demonstram que as NA apresentaram benefícios na recuperação da força e coordenação pelo teste de suspensão, no qual o medicamento SNT demonstrou piora.

Campo aberto

Na Figura 3, são apresentadas as médias e desvio padrão para cada grupo, referentes ao resultado do teste motor baseado no protocolo de avaliação do campo aberto, que avalia o número de elevações do animal durante o teste.

Pelo teste de Friedman o valor de $p<0,001$. Através do *Durbin-Conover* encontramos resultados significantes entre o GC14 e GNA14 ($p<0,001$).

Na Figura 4, são representados as médias e desvio padrão para cada grupo, referentes ao resultado do teste motor baseado no protocolo do Campo aberto avaliando o comportamento de congelamento do animal. A análise do

congelamento, consiste no tempo que o animal permanece estático (após três segundos sem movimento) no período de cinco minutos.

Figura 3. Gráfico da média e desvio padrão do efeito da administração de NA e de SNT no teste do Campo aberto, resultado representado pelo comportamento de elevação do animal.

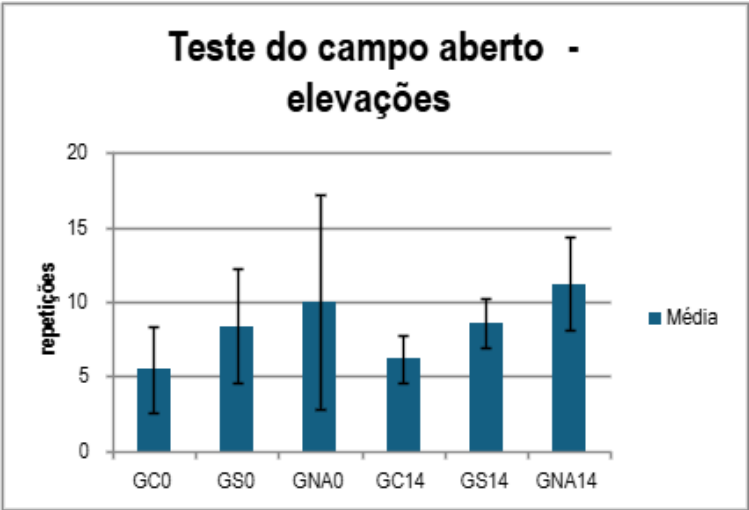
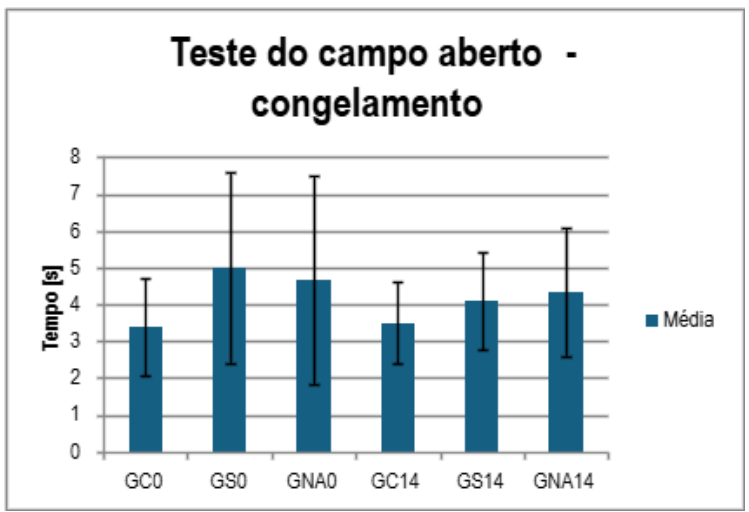


Figura 4. Gráfico da média e desvio padrão do efeito da administração de NA e de SNT no teste do Campo aberto, resultado representado pelo comportamento de congelamento do animal.



Pelo teste de Friedman o valor de $p=0,028$. Através do *Durbin-Conover* encontramos resultados significantes apenas entre o GS0 e GC0, resultados esse sem grande importância para conclusões. Portanto observamos que os grupos não apresentaram grandes diferenças em relação ao presente comportamento.

A avaliação da atividade motora realizada através do teste, no qual avaliou o congelamento dos ratos, o grupo de animais com isquemia tratados com NA (GNA14 e GNA0) exibiu pequena redução do comportamento com $p=0,97$. No entanto, o grupo controle apresentou o oposto, elevando de maneira branda o comportamento de congelamento ($p=0,824$).

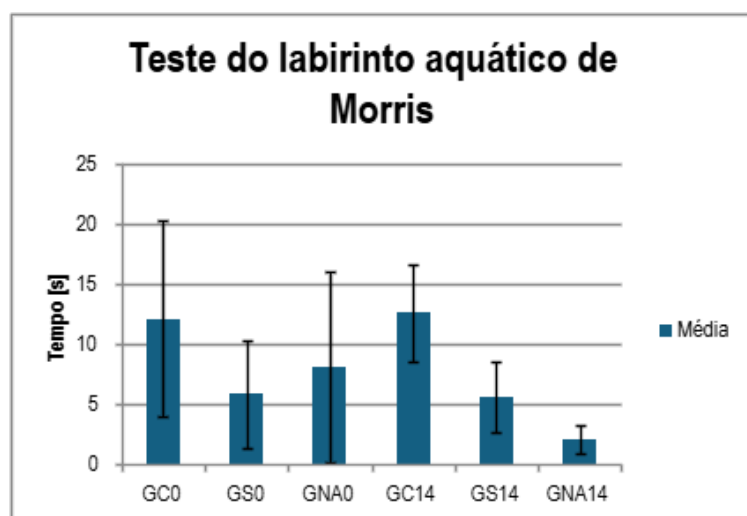
Labirinto aquático de Morris (LAM)

As médias e desvio padrão do tempo de latência de escape para cada grupo estão representados na Figura 5, de acordo com o teste aquático baseado no princípio do LAM. Este teste teve como objetivo avaliar a aprendizagem espacial e a memória. Quanto menor o resultado, ou seja, menor o tempo da latência de escape, mais rápido o rato realizou o teste. O teste de Friedman apresentou valor de $p=0,001$.

Entre os grupos tratados durante 14 dias, observa-se na figura que o GNA14 apresentou menor média comparado ao GC14 e GS14, exibindo melhores resultados, com diferenças significativas com $p<0,001$ através do teste *Durbin-Conover*. Também, o GNA14 apresentou resultados

menores significativos ao GNA0. Assim, a ingestão de NA resultou em melhores índices de aprendizado espacial e memória, pois os animais realizaram o teste em menor tempo.

Figura 5. Gráfico da média e desvio padrão do efeito da administração de NA e de SNT no teste do labirinto aquático de Morris, representado em segundos.



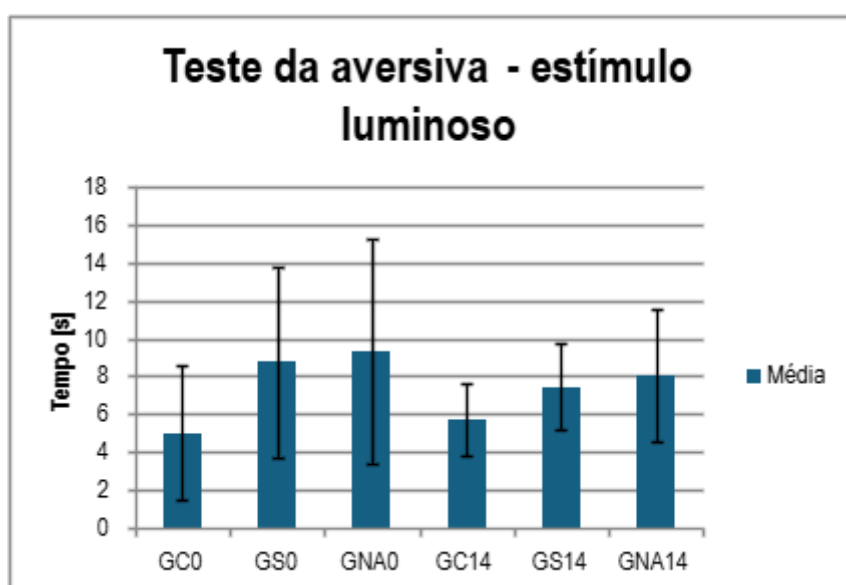
Memória Aversiva

Na Figura 6, os resultados do teste aversiva durante o estímulo luminoso é representado no gráfico. O objetivo do teste foi avaliar o medo condicionado durante o estímulo da luz através do comportamento de congelamento.

No teste de Friedman o valor de $p < 0,001$ indicou nível de significância. Através do *Durbin-Conover* encontramos resultados significantes entre os grupos GC14 e GNA14 (0,002).

Os grupos GS0 e GNA0 apresentaram as maiores médias do tempo de congelamento quando comparados ao GC0. O GC0 apresentou a menor média, porém é importante ressaltar que o mesmo já havia demonstrado o grupo com menores resultados. Quando comparamos o GC0 e GC14 ocorre um aumento no tempo de congelamento (Figura 6).

Figura 6. Gráfico da média e desvio padrão do efeito da administração de NA e de SNT no teste da Aversiva, resultado representado pelo comportamento de congelamento do animal em segundos, durante o estímulo luminoso.

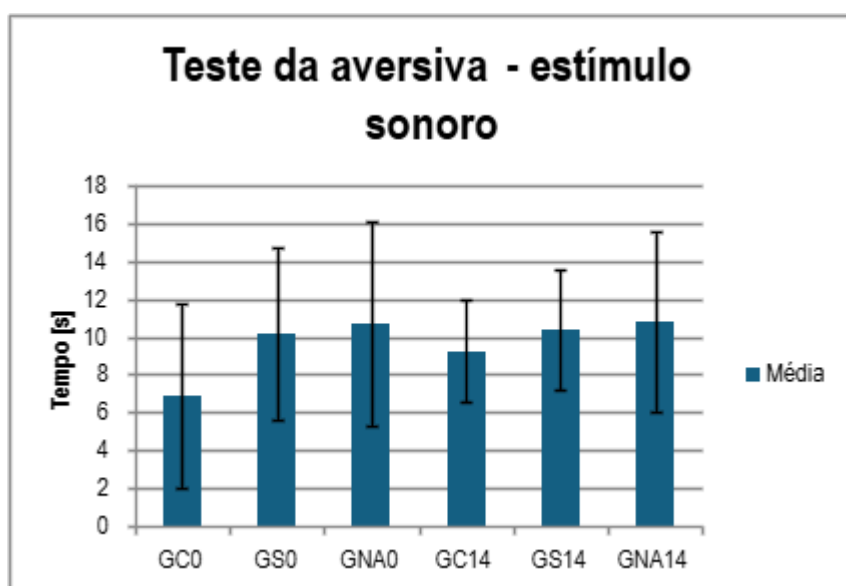


Entretanto, comparando os grupos pós-lesão e tratamento do NA e da SNT, observa-se que houve redução em ambos os grupos tratados, diferentemente do grupo controle que ocorreu um aumento após o tratamento, todos sem diferenças significantes. Comparando os resultados do tratamento do GNA14 com o GS14, não encontramos diferenças significantes ($p=0,557$), ou seja, os dois grupos apresentaram diminuição do tempo de congelamento, porém

sem grandes diferenças. A partir dos resultados, os grupos tratados com NA e sinvastatina apresentaram resultados não esperados, sendo inferiores ao grupo controle.

No teste aversiva, estímulo sonoro o valor de Friedman foi de $p=0,002$. Através do *Durbin-Conover* encontramos resultados significantes do GC0 com o GS0, GS14, GNA0 e GNA14, achado esse sem grande importância (Figura 7). Contudo, comparando os mesmos grupos aos tratados, vemos que os grupos SNT e NA manterem seus resultados, com leves aumentos, entretanto, o grupo controle após o tratamento aumentou de forma expressiva o tempo de congelamento, com significância (0,021) pelo teste de comparação múltipla.

Figura 7. Gráfico da média e desvio padrão do efeito da administração de NA e de SNT no teste da Aversiva, resultado representado pelo comportamento de congelamento do animal em segundos, durante o estímulo sonoro.



DISCUSSÃO

Analizamos o efeito de nanopartículas contendo HUM como potencial efeito neuroprotetor no tratamento do AVC isquêmico experimental devido suas propriedades anti-inflamatórias e o tratamento com a SNT, um fármaco do grupo das estatinas, muito utilizado na prevenção do AVC. As NA e a SNT 20mg foram administrados desde o momento em que os animais acordaram da anestesia, a cada 24 horas durante 14 dias, por gavagem sendo 6µg a dose diária dos compostos.

As nanopartículas apresentaram tamanho médio de 210,1nm com PDI de 0,09. Nanopartículas com diâmetros médios menores que 300nm e PDI inferiores a 0,2, indicam uniformidade e estabilidade boa de sistema coloidal¹⁴. A homogeneidade da distribuição do tamanho das nanopartículas se refere ao PDI, sendo que valores mais baixos indicam uma distribuição mais uniforme¹⁵. A análise do potencial Zeta (+45,0mV) indicou estabilidade físico-químico da solução coloidal, pois resultados superiores ou iguais a 30mV evita a agregação ou floculação¹⁶. A eficiência de encapsulação foi de 64%, resultados inferiores a outro estudo que apresentou encapsulamento de 80% do óleo essencial de *Piper nigrum* em nanopartículas biodegradáveis com material de parede a poli-ε-caprolactano e gelatina¹⁷. Sendo que os compostos naturais apesar de suas atividades biológicas, apresentam limitação pela volatilidade e degradação acelerada, assim para prolongar sua eficácia o encapsulamento em nanopartículas. A biodisponibilidade

melhorada devido ao uso das nanopartículas, age mais eficaz contra a isquemia cerebral, potencializando a ação da curcumina¹⁸.

Foram aplicados os seguintes testes: apreensão, suspensão, aversiva, campo aberto e LAM. De acordo com o teste de Friedman, os resultados indicam a existência de diferenças entre os grupos em todos os testes aqui avaliados, sendo o valor significativo, com valor p inferior a 0,05 é rejeitado a hipótese nula. Entretanto o teste não especifica onde estão as diferenças, dessa forma, foi realizado o teste de comparação múltipla (*Durbin-Conover*), para explicitar os resultados mais relevantes.

O teste campo aberto é utilizado para observar a atividade exploratória dos animais, avaliando a capacidade motora. No presente estudo, foi analisado o congelamento e as elevações dos animais submetidos ao teste. Os grupos pós-tratamento com NA e SNT exibiram menores índices do comportamento de congelamento, comparados aos respectivos grupos pré-tratamento, apresentando resultados parecidos, no qual o grupo SNT apresentou menor média e consequentemente, melhor resultado. Diferentes resultados foram observados no grupo controle, no qual ocorreu um leve aumento do congelamento dos animais. Quanto maior a ocorrência do presente comportamento, maior indicativo de ansiedade do animal, dessa forma, os animais com lesão isquêmica sem tratamento exibiram maior índice de ansiedade comportamental e consequentemente pior comportamento motor¹⁹.

Através do comportamento de elevações e deambulação o animal busca informações do ambiente desconhecido, sendo um comportamento exploratório²⁰. Os resultados do comportamento de elevações, os grupos pós-tratamento evidenciaram um aumento deste comportamento, sendo que o tratamento com NA exibiu os melhores resultados indicando uma significativa recuperação. No entanto, o grupo da SNT mostrou leve aumento, sem índices significantes. Resultados semelhantes foram observados em estudo com animais tratados com β -cariofileno demonstraram maior capacidade exploratória, passaram menos tempo imóvel, visto que percorreram maiores distâncias com maior velocidade²¹. Através dos resultados do presente teste, as NA e a SNT demonstraram resultados de melhorias no comportamento motor após lesão isquêmica. Em um estudo semelhante foi constatado que houve melhora no desempenho da memória espacial pelos ratos com e sem lesão por anoxia, sendo que os animais saudáveis apresentaram resultados significativamente melhores ao longo de 10 dias de teste, expresso por latências menores²². Os animais lesionados sem tratamento apresentaram desempenho inferior da capacidade de aprendizado, no qual mostram tempo de latência maiores em comparação aos animais controle.

No teste Aversiva, o comportamento do congelamento pelo estímulo sonoro apresentou resultados semelhantes entre os grupos, com exceção do tratamento controle, no qual exibiu maior aumento do "congelamento". Observamos

que os grupos tratados com NA e SNT apresentaram mínimo aumento do congelamento sem diferenças significantes. No entanto o grupo controle apresentou resultados significativamente maiores após 14 dias. Os resultados apontam que a administração de nanopartículas de HUM e de SNT não demonstraram melhora na recuperação da aprendizagem, visto que maior tempo do comportamento do congelamento indica maior aprendizado pelo presente teste.

O tempo do congelamento pode ser caracterizado pelo aprendizado da associação do estímulo condicionado ao incondicionado, no qual o congelamento é um complexo padrão comportamental, que se constitui pela ausência dos movimentos com exceção da respiração²². A experiência com o choque elétrico ou com estímulos pareados com ele, como os estímulos visuais, afetaria o processo exploratório, diminuindo sua intensidade. A suspensão da atividade é uma reação dos animais aos estímulos ambientais associados ao choque, como o sinal sonoro e luminoso²³.

Em relação ao mesmo comportamento estimulado pela luz e choque, os grupos tratados com NA e SNT exibiram uma redução na média do congelamento sem diferenças significantes. Enquanto o grupo controle demonstrou um aumento do comportamento de congelamento dos animais, ainda que sem diferenças significantes. As NA e a SNT apresentou uma redução do comportamento do congelamento, mesmo que sem grandes diferenças. Resultados semelhantes foram encontrados em estudo com animais lesionados que não tiveram sua capacidade

associativa afetada, pois apresentaram pouca diferença ao grupo sem lesão, indicando menor tempo de congelamento²². Sendo que o aumento deste comportamento indica melhor capacidade associativa do animal no teste aversiva.

No teste de apreensão, as NA apresentaram melhora comparado ao mesmo grupo sem tratamento ($p < 0,001$), indicativo de melhora na recuperação funcional em ratos com isquemia. No grupo tratado com SNT houve um pequeno aumento dos resultados ($p = 0,077$) e o grupo controle apresentou um mínimo aumento. Em um estudo similar, também foi observado melhora no comportamento motor de ratos com déficits neurológicos induzidos pelo AVC através do teste de apreensão pelo uso de LED 630nm comparados ao controle²⁴. Já no estudo com as nanopartículas poliméricas de ácido retinóico demonstraram resultados positivos na recuperação do cérebro isquêmico, aumentando a força de preensão e reduzindo o volume do infarto²⁵.

O teste de suspensão foi desenvolvido para avaliar a força por meio da latência da queda¹⁰. O tratamento com NA apresentou maiores médias entre os grupos tratados com diferenças expressivas no teste (0,010), indicando maior tempo de suspensão e consequentemente maior força funcional. Entretanto, o grupo tratado com SNT levou a uma diminuição importante da média do tempo de suspensão ($p = 0,060$), evidenciando piora nos resultados. Já o grupo controle apresentou resultados semelhantes, apontando que a força funcional se manteve. Ratos machos submetidos a

hipóxia-isquêmica neonatal apresentaram desempenho inferior na variável latência de queda pelo teste de suspensão e outra variável que alterou o desempenho motor dos ratos foi o tempo de lesão, no qual maior tempo de lesão (22 e 42 dias) foi associado a maiores danos ao cérebro²⁶.

CONCLUSÃO

Diante dos resultados, observa-se que o tratamento com NA aplicado após o AVC foi superior ao tratamento com SNT e sem tratamento. As respostas aos testes com o tratamento das NA indicam melhora na capacidade funcional, motora e no aprendizado e memória em modelo experimental com ratos. Dessa forma, esses achados apontam sua ação através das propriedades anti-inflamatória do composto alfa-humuleno, com biodisponibilidade melhorada devido ao uso de nanopartículas para potencializar a sua ação, interferindo de forma benéfica na neuro inflamação cerebral isquêmica.

AGRADECIMENTOS

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa de mestrado, suporte financeiro 001.

REFERÊNCIAS

1. Chauhan G, Debette S. Genetic risk factors for ischemic and hemorrhagic stroke. *Curr Cardiol Rep* 2016;18:124. <https://doi.org/10.1007/s11886-016-0804-z>
2. Lo EH, Dalkara T, Moskowitz MA. Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. *Nature Rev Neurosci* 2003;4:399-414. <https://doi.org/10.1038/nrn1106>

3. Zhou Y, Peng Z, Seven ES, Leblanc RM. Crossing the blood-brain barrier with nanoparticles. *J Control Rel* 2018;270:290-303. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.12.015>
4. Vajda FJE. Neuroprotection and neurodegenerative disease. *J Clin Neurosci* 2002;9:4-8. <https://doi.org/10.1054/jocn.2001.1027>
5. Fernandes ES, Passos GF, Medeiros R, Cunha FM, Ferreira J, Campos MM, *et al.* Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. *Eur J Pharmacol* 2007;569:228-36. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar>
6. Sun C, Dai L, Liu F, Gao Y. Simultaneous treatment of heat and high pressure homogenization of zein in ethanol-water solution: Physical, structural, thermal and morphological characteristics. *Innov Food Sci Emerg Technol* 2016;34:161-70. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.01.016>
7. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Vol. 7. Sydney: Academic Press; 2013.
8. Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski H. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke* 1986;17:472-6. <https://doi.org/10.1161/01.str.17.3.472>
9. Bertelli JA, Mira JC. The grasping test: a simple behavioral method for objective quantitative assessment of peripheral nerve regeneration in the rat. *J Neurosci Methods* 1995;58:151-5. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(94\)00169-h](https://doi.org/10.1016/0165-0270(94)00169-h)
10. Pazaiti A, Soubasi V, Spandou E, Karkavelas G, Georgiou T, Karalis P, *et al.* Evaluation of long-lasting sensorimotor consequences following neonatal hypoxic-ischemic brain injury in rats: the neuroprotective role of MgSO₄. *Neonatology* 2009;95:33-40. <https://doi.org/10.1159/000151753>
11. Stein C, Bueno OFA, Xavier GF. Rats do react to stimulus omission. *Braz J Med Biol Res* 1994;27:2423-30. <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-152623>
12. Vorhees CV, Williams MT. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat Protoc* 2006;1:848-58. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.116>
13. Boakes RA. The impact of Pavlov on the psychology of learning in English-speaking countries. *Span J Psychol* 2003;6:93-8. <https://doi.org/10.1017/s1138741600005242>
14. Schaffazick SR, Guterres SS. Caracterização e Estabilidade Físico-química de Sistemas Poliméricos Nanoparticulados para Administração de Fármacos. *Quím Nova* 2003;26:726-37. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422003000500017>
15. Campelo PH, Junqueira LA, Rezende JV, Zacarias RD, Fernandes RVB, Botrel DA, *et al.* Stability of Lime Essential Oil Emulsion Prepared Using Biopolymers and Ultrasound Treatment. *Inter J Food Prop* 2017;2:564-79. <https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1303707>

16. Roland I, Piel G, Delattre L, Evrard B. Systematic characterization of oil-in-water emulsions for formulation design. *Inter J Pharmac* 2003;263:85-94. [https://doi.org/10.1016/s0378-5173\(03\)00364-8](https://doi.org/10.1016/s0378-5173(03)00364-8)
17. Da Costa IC. Nanopartículas poliméricas preenchidas com óleo essencial de *Piper nigrum*: Caracterização Química e Morfológica (Dissertação). Manaus: Universidade Federal do Amazonas; 2020. <https://tede.ufam.edu.br/handle/tede/7611>
18. Kakkar V, Muppu SK, Chopra K, Kaur IP. Curcumin loaded solid lipid nanoparticles: an efficient formulation approach for cerebral ischemic reperfusion injury in rats. *Eur J Pharm Biopharm* 2013;85:339-45. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2013.02.005>
19. De Paiva CL, Alves LRL, De Lade CG, Bolotari M, Rocha BMO, Peters VM, *et al.* Avaliação comportamental em ratos obesos submetidos a treinamento físico de endurance e hiit. *Princípios* 2022;22-1-14. <https://doi.org/10.34019/2179-3700.2022.v22.37902>
20. Silva CA, De Hollanda LM, Sacilotto MCB, Peterman CED, Damião D. Análise comportamental em ratos jovens tratados com nicotina: comportamento e nicotina. *Farmacologia integrada: pesquisas emergentes em casos, efeitos e uso clínicos*. Guarujá: Científica digital; 2022. <https://doi.org/10.37885/220408546>
21. Amaral AV. Avaliação do potencial neuroprotetor do beta cariofileno em modelo murino de doença de parkinson induzido por 6-hidroxidopamina (Dissertação). Belém: Universidade Federal do Pará; 2019. <https://repositorio.ufpa.br/jspui/handle/2011/13380>
22. Ito PH. Avaliação comportamental de ratos submetidos à anoxia neonatal (Dissertação). São Paulo: Universidade de São Paulo; 2010. <https://doi.org/10.11606/D.47.2010.tde-30072010-112514>
23. Ades C, Oliveira JBL, Bahia AMB. Estimulação aversiva e exploração dirigida no rato. *Rev Latinoam Psicol* 1976;8:295-302. <https://www.redalyc.org/pdf/805/80580210.pdf>
24. Fonseca EGJ, Neuls D, Pedroso A, Barbosa D, Dubiela A, Cidral F, *et al.* Analysis of motor behavior and neuroplasticity in an experimental model of hemiplegia treated with transcranial therapy. *Inter J Res* 2021;9:137-48. <https://doi.org/10.29121/granthaalayah.v9.i6.2021.3947>
25. Machado-Pereira M, Gayston A, Garcia-Gabilondo M, Francisco V, Cristóvão A, Marto J, *et al.* Retinoic Acid-Loaded Nanoparticles Promote Neurovascular Protection in Stroke. *Stroke* 2023;54:149-51. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.122.041839>
26. Goldani R. Efeito do enriquecimento ambiental nas alterações motoras de ratos submetidos à hipóxia-isquemia neonatal (Dissertação). Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2010. <http://hdl.handle.net/10183/34152>