

## ADMINISTRAÇÃO INTRAVENOSA DE LIPOSSOMAS CONTENDO UMA FRAÇÃO SEMI-PURIFICADA DA PLANTA *TRICHILIA CATIGUA* (CATUABA) EM CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DE ISQUEMIA CEEBRAL – PARTE I: AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE TÉCNICA E BIOLÓGICA

Joshua Yamakami (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Luana Yukari Chinen, Humberto Milani (Orientador). E-mail: hmilani@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Maringá, PR.

**Área e subárea de conhecimento: Farmacologia, Neuropsicofarmacologia.**

**Palavras-chave:** Isquemia cerebral; *Trichilia catigua*; Lipossomas.

### RESUMO

Isquemia cerebral é uma condição clínica severa que decorre, mais frequentemente, da oclusão de um ou mais vasos sanguíneos cerebrais (típico AVC), ou de uma parada cardíaca reversível (não-fatal), deixando sequelas incapacitantes. Estudos anteriores do nosso laboratório, demonstraram que o tratamento com a fração acetato de etila (FAE, 400 mg/kg) preparada a partir da planta *Trichilia catigua* (catuaba) reduziu tanto o déficit de memória, quanto o estresse oxidativo desencadeados pela isquemia cerebral em ratos. Nesse projeto de IC objetivamos avaliar 1º) a viabilidade biológica da administração intravenosa (I.V) de uma solução de lipossomas contendo a FAE de *T. catigua*, e 2º) se tal tratamento protege contra o estresse oxidativo desencadeado pela isquemia. Resultados: A administração I.V. de lipossomas contendo a FAE se mostrou plenamente viável, pois não houve nenhuma alteração comportamental que indicasse a inviabilidade de tal administração. Detectamos, contudo, um leve e temporário aumento da temperatura retal, refletindo, provavelmente um estado febril passageiro. A avaliação sobre o efeito antioxidante dos lipossomas administrados por via I.V. não foi conclusiva, pois, inesperadamente, a isquemia não provocou a resposta de estresse oxidativo (grupo controle isquêmico), resultado este que diverge de experimentos anteriores deste laboratório.

### INTRODUÇÃO

A doença cerebral isquêmica, aguda ou crônica, é uma condição clínica grave, decorrente de múltiplas causas. Após um evento cerebral isquêmico, entretanto, a lesão cerebral, em maior ou menor grau, é uma consequência imediata, deixando sequelas parcial ou totalmente irreversíveis. Em continuidade a estudos anteriores deste laboratório, o objetivo desse projeto de IC consistiu em averiguar a viabilidade biológica da administração intravenosa de uma formulação lipossômica da FAE

(FAE-Lip). Caracteristicamente, substâncias polifenólicas contidas em extratos vegetais têm baixa biodisponibilidade oral, o que demanda o uso de altas doses. O emprego de lipossomas como sistema de liberação de fármacos pode melhorar a solubilidade e biodisponibilidade dos princípios ativos de uma planta ou seu extrato (Saraf, 2021; Bozzuto & Molinari, 2015). Assim, esse estudo é preliminar, com vistas a avaliar a eficácia pré-clínica de lipossoma contendo a FAE de *T. catigua* num modelo animal de isquemia cerebral global e transitória (ICGT).

## MATERIAIS E MÉTODOS

### *Animais*

Ratos Wistar (180-230 g) foram alojados com ciclo de luz controlado, temperatura ambiente  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , e acesso livre à água e ração. Todos os procedimentos seguiram aprovação ética do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA nº 1399190422).

### *Viabilidade biológica da administração intravenosa da solução de lipossoma da FAE*

Ratos intactos foram levemente anestesiados em uma cuba saturada com isoflurano, possibilitando a correta administração dos lipossomas da FAE (0,14 mg/kg, i.v., 1 ml/kg) através da veia peniana. Após recuperação da anestesia, os animais foram observados quanto ao seu bem-estar geral, atentando-se para manifestações de comportamentos considerados atípicos, como piloereção, tosse/espirros, postura corporal diferente do habitual, movimentação em campo aberto, presença de tremores, convulsão ou mesmo morte.

### *Isquemia cerebral*

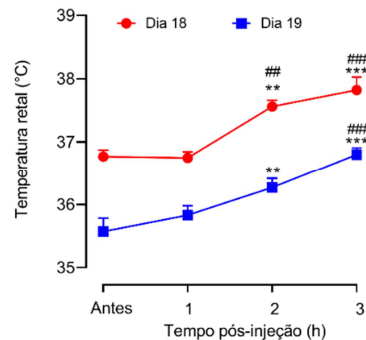
Os animais foram anestesiados usando a mistura de isoflurano/oxigênio liberada através de uma máscara fixada no focinho do animal. A ICGT foi induzida conforme o modelo de oclusão do 4-vasos, ou seja, oclusão permanente das artérias vertebrais, seguida da oclusão transitória (15 minutos) das artérias carótidas comuns, conforme rotina deste laboratório. Uma hora após a cirurgia, os animais receberam a injeção I.V. de lipossomas da FAE, ou veículo (salina).

### *Estresse oxidativo*

O estresse oxidativo resultante da isquemia foi avaliado através da atividade das enzimas superóxido dismutase (SDO) e catalase (CAT), nível de carbonilação proteica (CBP), e lipoperoxidação (TABARS, *tiobarbituric acid reactive substances*). Essas medições seguiram a metodologia de estudos anteriores (Godinho et al., 2018, Oliveira et al., 2023) em colaboração com o Laboratório de Oxidações Biológicas do Departamento de Bioquímica.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### *Viabilidade biológica da administração intravenosa da solução de lipossoma da FAE*

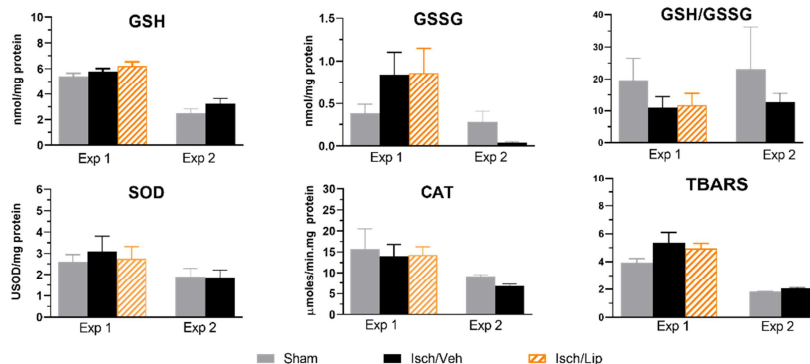


**Figura 1** – Temperatura retal medida antes e 1, 2 e 3 horas após a injeção I.V. de lipossoma da FAE, em dois dias subsequentes (18 e 19). Os valores são a média +/- EPM. Sample, n=10. \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.0001 comparado ao basal (Antes); ##p < 0.01; ###p < 0.0001 comparado à 1ª. hora.

Quanto ao comportamento geral do animal, não detectamos nenhuma alteração que pudesse indicar algum efeito deletério da administração I.V. de lipossomas. Deduzimos, portanto, que a administração I.V. da solução de lipossoma da FAE é um procedimento biologicamente viável. Entretanto, observamos uma leve e transitória alteração da temperatura retal. A figura 1 mostra a variação de temperatura retal medida antes (basal) da administração I.V. de lipossoma, e até 3 horas após, em dois dias subsequentes de administração (Dias 18 e 19). No Dia 18, a temperatura se elevou de  $36.7 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$  (basal) para  $37.8 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$  após a 3ª. hora pós-administração ( $p < 0.001$ ). Padrão semelhante foi observado no Dia 19 ( $35.6 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$  (basal) para  $36.8 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$  após a 3ª. hora;  $p < 0.001$ ), indicando, talvez, um leve estado febril. A temperatura retal também foi diferente entre os dias 18 e 19 ( $p < 0.001$ ). Não temos uma explicação para as diferenças significativas de temperatura de um dia para o outro, no mesmo animal, antes e após as injeções.

### Extresse oxidativo

A figura 2 mostra que a isquemia cerebral não resultou em exacerbação do estresse oxidativo (grupo Isch/Veh vs. grupo Sham,  $p > 0.05$ ), ou seja, não houve indução do estresse oxidativo. Comparado com estudos anteriores, esse resultado foi algo inesperado, não permitindo qualquer conclusão acerca do suposto efeito antioxidante do lipossoma da FAE (grupo Isch/Lip).



**Figura 2** – Efeito do tratamento com FAE-Lip (0.14 mg/kg/ml, I.V.) sobre o estresse oxidativo induzido por isquemia cerebral. GSH (glutathiona reduzida), GSSG (glutathiona oxidada), SOD (superóxido dismutase), CAT (catalase), TBARS (substância reativa ao ácido tiobarbitúrico). O experimento 2 (Exp. 2) foi conduzido somente com os grupos 'sham' e isquêmico/veículo (Isch/Veh) para certificarmos a falta de efeitos da isquemia durante o experimento com o lipossoma (Exp 1). Sham = controle, Isch/Veh = ischemia + veículo, Isch/Lip = ischemia + lipossoma.

## CONCLUSÃO

A administração intravenosa da solução de lipossoma provou ser um procedimento viável, apesar do efeito possivelmente pirogênico, porém, transitório. A conclusão quanto ao efeito antioxidante do lipossoma elaborado a partir de um extrato (FAE) da planta *Trichilia catigua* (catuaba) não pôde ser alcançada, pois a isquemia, por si, não provocou o estresse oxidativo. Esse resultado foi inesperado, pois não reproduziu dados anteriores deste laboratório. Não temos, ainda, uma explicação para a tal resultado. Experimentos futuros deverão investigar possíveis falhas metodológicas.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Fundação Araucária, CNPq e CAPES pelo auxílio financeiro. E, também um agradecimento especial ao Prof. Dr. Humberto Milani e Me. Luana Yukari Chinen pela orientação na vigência deste projeto.

## REFERÊNCIAS

GODINHO, J. et al. Ethyl-acetate fraction of *Trichilia catigua* restores long-term retrograde memory and reduces oxidative stress and inflammation after global cerebral ischemia in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 337, p. 173–182, 30 jan. 2018.

OLIVEIRA D. V. et al. Delayed administration of a *Trichilia catigua* lyophilized extract prevents oxidative stress, stimulates dendritic/synaptic plasticity, and restores memory function after global cerebral ischemia. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 24; p. 306:116176, 15 jan. 2023

SARAF, S. Applications of novel drug delivery system for herbal formulations. **Fitoterapia**, v. 81, n. 7, p. 680–689, out. 2010.

BOZZUTO, G.; MOLINARI, A. Liposomes as nanomedical devices. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 975, fev. 2015.