

MARIANE MARIA SILVEIRA VIEIRA DE LIMA

**ANÁLISE QUANTITATIVA E QUALITATIVA POR
NANOPARTÍCULAS DE RESVERATROL EM MODELO DE
NEUROINFLAMAÇÃO**

GUARAPUAVA

2021

MARIANE MARIA SILVEIRA VIEIRA DE LIMA

**ANÁLISES QUANTITATIVA E QUALITATIVA NA
NEUROPROTEÇÃO POR NANOPARTÍCULAS DE
RESVERATROL EM MODELO DE NEUROINFLAMAÇÃO**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção de grau de Mestre em Ciências, Curso de Pós-Graduação em Nanociências e Biociências, área de concentração de Materiais, da UNICENTRO

Orientador: Prof. Dr. Ivo Ilvan Kerppers

Co-Orientador: Prof. Dr^a. Rubiana Mara Mainardes

GUARAPUAVA

2021

Catálogo na Publicação
Rede de Bibliotecas da Unicentro

L732a

Lima, Mariane Maria Silveira Vieira de

Análise quantitativa e qualitativa por nanopartículas de resveratrol em modelo de neuroinflamação / Mariane Maria Silveira Vieira de Lima. – – Guarapuava, 2021.

xv, 58. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de concentração: Nanociências e Biociências, 2021.

Orientador: Ivo Ilvan Kerppers

Coorientadora: Rubiana Mara Mainardes

Banca examinadora: Weber Claudio Francisco Nunes da Silva, Wagner Menna Pereira

Bibliografia

1. Resveratrol. 2. Beta Amilóide1-42. 3. Nanopartículas. 4. Agentes Neuroprotetores. I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Ciências.

CDD 615

TERMO DE APROVAÇÃO

MARIANE MARIA SILVEIRA VIEIRA DE LIMA

ANÁLISE QUANTITATIVA E QUALITATIVA NA NEUROPROTEÇÃO POR NANOPARTÍCULAS DE RESVERATROL EM MODELO DE NEUROINFLAMAÇÃO

Dissertação aprovada em 16/08/2021 como requisito parcial à obtenção de grau de Mestre em Ciências, Curso de Pós-Graduação em Nanociências e Biociências, área de concentração de Materiais, da Universidade Estadual do Centro-Oeste, pela seguinte Banca Examinadora:



Prof. Dr. Ivo Ilvan Kerppers

Universidade Estadual do Centro-Oeste



Prof. Dr. Weber Claudio Francisco Nunes da Silva

Universidade Estadual do Centro-Oeste



Prof. Dr. Wagner Menna Pereira

Uniguairacá

Guarapuava, 16 de Agosto de 2021

AGRADECIMENTOS

A Deus e a Nossa Senhora Aparecida por me darem condições de buscar meus sonhos e sempre me guiarem em minhas decisões.

A minha mãe Maria Idalina que foi e sempre será minha maior estimuladora a buscar mais conhecimentos inspirando-me no profissionalismo.

Ao meu esposo Alvaro pela paciência com minhas ausências e pelo apoio e incentivo em minhas decisões.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ivo Ilvan Kerppers pela confiança e pelo grande exemplo de profissionalismo e educador.

Aos alunos da iniciação científica que colaboraram com o desenvolvimento da pesquisa.

A todos que, direta ou indiretamente, auxiliaram a realização deste trabalho, os mais sinceros reconhecimentos.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas, o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”

Santa Teresa de Calcutá

RESUMO

Ao longo dos últimos anos a DA vem sendo estudada como uma denominação de disfunção neurodegenerativa, uma doença que atua de forma progressiva com acúmulo de Beta Amilóide (A β). Embora a causa exata da DA precise ser mais elucidada devido à sua complexidade, linhas crescentes destacam que o acúmulo de agregados de proteína A β é um dos eventos causadores na patogênese da DA. O acúmulo desses agregados de proteína desencadeia neuroinflamação, estresse oxidativo e dano mitocondrial, levando à perda de neurônios. Desta forma um grande promissor é o Resveratrol (antiinflamatório, antioxidante, antitumorais e neuroprotetor). Sendo assim, o presente estudo tem como objetivo avaliar os efeitos das nanopartículas de zeína contendo resveratrol em um modelo experimental de neuroinflamação. Trata-se de um estudo experimental, descritivo e observacional sendo realizada no laboratório de Neuroanatomia da Universidade Estadual do Centro Oeste (UNICENTRO). Amostra foi composta por 30 animais divididos em controle (C), controle positivo (CP), nanopartículas brancas (NB), nanopartículas de Resveratrol (NR) e resveratrol (R). Os animais receberam por gavagem 10mg/kg diariamente, diluídos em 0,5 ml por 15 dias. Após foram submetidos à cirurgia estereotáxica e mantidos por 30 dias para análise Imunohistoquímica (IHC). Os resultados apontaram que nas análises qualitativas da IHC, para avaliação da deposição de Anti Beta Amilóide não houve alteração em sua composição morfológica encefálica nos grupos NR e C, diferentemente dos grupos CP, NB e R que apresentaram alteração na deposição de Anti Tau percebeu-se que no grupo NR houve a projeção normal de taurina no axônio a qual não correspondeu da mesma forma para os demais grupos, para o marcador CD68 nos grupos R e C não houve ativação da micróglia. As análises quantitativas de Anti Beta Amilóide no grupo NR, houve diferença estatística quando comparado com os grupos CP, NB e R, já na análise de Anti Tau houve uma diferença significativa entre os grupos CP e NR de ($p=0.0001$), e por fim para o marcador CD68 houve resultado significativo ($p=0.0014$) para C e NR. Na análise das citocinas pró e antiinflamatórias como a IL-10, IL-6, TNF- α e InF- δ que foram avaliadas através da citometria de fluxo e apresentando diferença significativa em TNF- α entre os grupos C, CP sendo o ($p=0.0272$), entre o grupo C e NB com a diferença de ($p=0.0076$), CP e NR ($p=0.0240$) e NB e NR com o ($p=0.0065$), único grupo que não houve diferença estatística foi o grupo R. Nas análises da IL-6 e InF- δ não apresentaram diferença significativa. Já na IL-10 apresentou significância entre os grupos C e NR com ($p=0.0001$), grupo C e R com ($p=0.022$) e por fim o grupo CP e NR com diferença estatístico sendo o ($p=0.0169$). Conclui-se que NR evitaram a evolução da neuroinflamação ocasionada pela indução de beta amilóide1-42 na região hipocámpica CA1.

Palavras-Chave: Resveratrol; Beta Amilóide1-42; Nanopartículas; Agentes Neuroprotetores.

ABSTRACT

Over the past few years, AD has been studied as a denomination of neurodegenerative dysfunction, a disease that acts progressively with the accumulation of Beta Amyloid (A β). Although the exact cause of AD needs to be further elucidated due to its complexity, growing lines highlight that the accumulation of A β protein aggregates is one of the causative events in the pathogenesis of AD. The accumulation of these protein aggregates triggers neuroinflammation, oxidative stress and mitochondrial damage, leading to the loss of neurons. Thus, a great promise is Resveratrol (anti-inflammatory, antioxidant, antitumor and neuroprotective). Therefore, this study aims to evaluate the effects of zein nanoparticles containing resveratrol in an experimental model of neuroinflammation. This is an experimental, descriptive and observational study being carried out in the Neuroanatomy laboratory of the State University of the Center West (UNICENTRO). Sample consisted of 30 animals divided into control (C), positive control (CP), white nanoparticles (NB), Resveratrol nanoparticles (NR) and resveratrol (R). The animals received 10mg/kg daily, diluted in 0, 5 ml for 15 days. Afterwards, they were submitted to surgery and kept for 30 days for immunohistochemical (IHC) analysis. The results showed that in the qualitative analysis of the IHC, to assess the deposition of Anti Beta Amyloid, there was no change in its morphological brain composition in the NR and C groups, unlike the CP, NB and R groups, which showed changes in the deposition of Anti Tau. It appears that in the NR group there was a normal projection of taurine in the axon which did not correspond in the same way to the other groups, for the CD68 marker in the R and C groups there was no microglial activation. Quantitative analyzes of Anti Beta Amyloid in the NR group showed a statistical difference when compared to the CP, NB and R groups, whereas in the Anti Tau analysis there was a significant difference between the CP and NR groups ($p=0.0001$), and by end for marker CD68 there was a significant result ($p=0.0014$) for C and NR. In the analysis of pro and anti-inflammatory cytokines such as IL-10, IL-6, TNF- α and InF- δ that were evaluated by flow cytometry and showing a significant difference in TNF- α between groups C, CP being ($p=0.0272$), between group C and NB with the difference of ($p=0.0076$), CP and NR ($p=0.0240$) and NB and NR with ($p=0.0065$), the only group with no statistical difference was the R group. In the analysis of IL-6 and InF- δ showed no significant difference. In IL-10, however, it showed significance between groups C and NR with ($p=0.001$), group C and R with ($p=0.022$) and finally the group CP and NR with a statistical difference being ($p=0.0169$). It is concluded that NR prevented the evolution of neuroinflammation caused by the induction of beta amyloid1-42 in the hippocampal region CA1.

Key words: Resveratrol; Beta Amyloid1-42; Nanoparticles; Neuroprotective agents.

LISTA DE SIGLAS

%EE	Porcentagem da eficiência de encapsulação
ACh	Acetilcolina
A β	Beta Amilóide
C	Controle
CCL	Comprometimento Cognitivo Leve
CEUA	Comitê de ética no uso de animais
CFL	Conjugado de fármaco lipídico
CP	Controle Positivo
DA	Doença Alzheimer
DLS	Espelhamento dinâmico de luz
ERK1 / 2	Sinal extracelular
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
GM-CSF	Fator de Crescimento
TNF- α	Fator de Necrose tumoral alfa
IDH	Índice De Desenvolvimento Humano
IHQ	Imunohistoquímica
IL-6	Interleucina- 6
IL-10	Interleucina -10
INF- δ	Interferon-Gama
Kg	Kilograma
LPS	Lipopolissacarídeo
MG	Miligrama
MM	Milímetro
NB	Nanopartículas Brancas

NF- κ B	Fator nuclear Kappa B
NLS	Nanopartículas lipídicas sólidas
NO	Óxido Nítrico
NR	Nanopartículas de resveratrol
OMS	Organização Mundial De Saúde
OS	Estresse Oxidativo
P38-MAPK	Proteínas cinases ativadas por mitogênio
PDI	Índice de polidispersão
PGC-1 α	Peroxisomo 1 α
PI3K	Fosfoinositida 3-quinase
PPA	Proteína Precursora Amilóide
QD	Quantum Dots
R	Resveratrol
SIRT1	Sistema de Regulação de informação silenciosa-1
SUS	Sistema Único De Saúde
UNICENTRO	Universidade Estadual do Centro Oeste
UV	Ultravioleta
VLN	Vetores lipídicos nanoestruturados

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1. ESQUEMA DA HIPÓTESE DA CASCATA AMILÓIDE.....	21
FIGURA 2. ESQUEMA HIPÓTESE DE EMARANHADOS NEUROFIBRILARES..	22
FIGURA 3. ESQUEMA HIPÓTESE DE DEFICIÊNCIA COLINÉRGICA.....	23
FIGURA 4. ESQUEMA HIPÓTESE DE EXCITOXICIDADE.....	24
FIGURA 5. ESQUEMA HIPÓTESE INFLAMAÇÃO, ESTRESSE OXIDATIVO E DISFUNÇÃO MITOCONDRIAL.....	25
FIGURA 6. ESTRUTURAS QUÍMICAS DO <i>TRANS</i> -RESVERATROL E DO <i>CIS</i> -RESVERATROL.....	27
FIGURA 7. ESQUEMA DAS NANOPARTÍCULAS DE RESVERATROL.....	31
FIGURA 8. ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA PARA MARCADOR ANTI-BETA AMILÓIDE.....	41
FIGURA 9. ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA DE PROTEÍNA TAU.....	43
FIGURA 10. ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA DE CD68.....	45
GRÁFICO 1. ANÁLISE QUANTITATIVA ANTI BETA AMILÓIDE.....	42
GRÁFICO 2. ANÁLISE QUANTITATIVA PARA ANTI TAU.....	44
GRÁFICO 3. ANÁLISE QUANTITATIVA PARA CD68.....	46
GRÁFICO 4. ANÁLISE QUANTITATIVA PARA TNF-ALFA.....	47
GRÁFICO 5. ANÁLISE QUANTITATIVA INTERFERON-GAMA.....	48
GRÁFICO 6. ANÁLISE QUANTITATIVA IL-10.....	49

GRÁFICO 7. ANÁLISE QUANTITATIVA IL-6.....	49
--	-----------

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. CARACTERÍSTICAS DAS NANOPARTÍCULAS RESVERATROL-QUITOZANA/ ZEÍNA

SUMÁRIO

1.Introdução.....	16
2 Objetivos.....	18
2.1 Objetivo Geral.....	18
2.2 Objetivos Específicos.....	18
3. Revisão de Literatura.....	19
3.1 Doença De Alzheimer / Neuroinflamação.....	19
3.2 Epidemiologia.....	20
3.3 Fisiopatologia.....	21
3.3.1 Hipótese de Cascata Amilóide.....	21
3.3.2 Hipótese de emaranhados neurofibrilares.....	22
3.3.3. Hipótese de deficiência colinérgica.....	23
3.3.4 Hipótese de Excitotoxicidade.....	24
3.3.5. Hipótese Inflamação, estresse oxidativo e disfunção mitocondrial.....	25
3.4 Resveratrol.....	26
3.5 Nanotecnologia.....	30
3.5.1 Nanopartículas.....	30
4.Material e Métodos.....	32
4.1 Materiais.....	32
4.2 Amostra.....	32
4.3 Grupo experimental.....	32
4.4 Preparação A β 1-42	33
4.5 Nanopartículas de Resveratrol.....	33
4.5.6 Preparação nanopartículas.....	33
4.5.7 Diâmetro médio e distribuição de tamanho.....	34
4.5.8 Zeta potencial.....	34
4.5.9 Determinação da eficiência de encapsulamento (EE).....	35
4.6 Cirurgia Experimental.....	35
4.6.1 Analgesia pós cirúrgica.....	36
4.6.2 Tratamento.....	36
4.6.3 Eutanásia.....	36
4.6.4 Decapitação.....	36
4.6.5Análise Histológica.....	36
4.6.6 Análise Imunohistoquímica.....	37

4.6.7 Citometria de Fluxo.....	38
5. Análise Estatística.....	39
6. Resultados.....	40
7.Discussão.....	50
8. Conclusão.....	52
9. Referências.....	53
ANEXO A: Aprovação CEUA.....	60

1. INTRODUÇÃO

A neuroinflamação segundo vários estudos observacionais e epidemiológicos acreditam que está na fisiopatologia da doença de Alzheimer (DA). A inflamação cerebral traz vários efeitos prejudiciais, pode ser visto na fase aguda que a inflamação é um mecanismo de defesa bem estabelecido contra um processo infeccioso, lesões e também toxinas. Já quando se encontram o processo inflamatório crônico ela está atribuída a sua ativação da micróglia e liberação de citocinas que vamos encontrando na DA (PANDEY *et al.*, 2020).

A DA foi descoberta e estudada pelo alemão médico psiquiatra Alois Alzheimer em meados de 1906, prevista como uma das principais causas de demência. Outros sintomas relatados incluíam falhas na memória recente, paranóia, problemas comportamentais e de linguagem, percebendo que havia um cérebro atrofico o qual se apresentava com sinais de deposição proteica, que por fim hoje são denominadas emaranhados neurofibrilares e placas senis (FALCO *et al.*, 2016). Atualmente, esta doença vincula-se provavelmente aos fatores ambientais e genéticos (SHENGQUAN *et al.*, 2020).

Ela também pode estar associada em casos mais raros de trissomia do cromossomo 21 pode se manifestar em idade menos avançada, neste caso sendo por volta dos 30 anos. Além de ser uma doença diretamente ligada com a neurodegeneração e diminuição da cognição, outras manifestações podem ser observadas, como as dificuldades com a linguagem, perda de memória, particularidades no reconhecimento facial e nomes, instabilidade emocional, perda de julgamento e também percebe-se alterações de personalidade (SAWDA, MOUSSA, TURNER, 2017).

Desta forma, ao longo dos últimos anos a DA vem sendo investigada como uma denominação de disfunção neurodegenerativas, levando ao quadro de demência mais causal na população idosa. A DA provoca alterações progressivas no tecido cerebral causando a perda de sinapses, lesões e também a morte neuronal, na qual primeira área a ser lesada é o hipocampo (SILVA *et al.*, 2018).

Percebe-se a necessidade de tratamentos preventivos se curativos para a doença para maiores chances de aumentar a expectativa de vida da população acometida. Segundo o protocolo clínico e diretrizes terapêuticas da Doença de Alzheimer, viabilizado pelo Ministério da Saúde há um reconhecimento através de uma avaliação com exames laboratoriais, exames de imagens, escalas e questionários direcionando

para os sinais e sintomas a partir dos quais encaminhamos pacientes para um tratamento que deve se manter de forma multidisciplinar. O objetivo do tratamento medicamentoso é propiciar a estabilização do comprometimento cognitivo, das atividades diárias sobre o comportamento, reduzindo efeitos adversos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Através das legislações que regem o Sistema Único de Saúde (SUS) garantirem o acesso aos medicamentos faz parte de uma política de saúde adequada, com isso há o empenho para que ocorra um fornecimento adequado e gratuito dos medicamentos, inclusive os de alto custo. Também há Programa de Medicamentos Excepcionais, no qual se inclui a população acometida pela DA (PIOVESANA *et al.*, 2012) .

O uso de medicamentos com ação multifuncional que inclui mais de duas ações correlacionadas com as atividades biológicas sobre a DA está apresentando uma abordagem viável com uma solução ideal na patogênese da doença (CHENG *et al.*, 2018).

Um fármaco que pode ser usado para a prevenção e tratamento da DA é o resveratrol, o qual ocorre em duas formas isoméricas; nomeadas como *trans*-resveratrol e *cis*-resveratrol, sendo que o diidro-resveratrol é um metabólito do *cis* e *trans*-resveratrol com peso molecular diferente. A forma predominante e bioativo que exhibe um amplo espectro farmacológico é o *trans*-resveratrol, que apresenta múltiplas funções, incluindo redução de beta amiloide ($A\beta$), eliminação de radicais livres e ação de atividades inibidoras de agregação fibrilares. Além disso, este polifenol que é de ocorrência natural promove benefícios contra a neurodegeneração por conta de suas características antiinflamatórias e antioxidantes (JERÁBEK *et al.*,2017)

2.OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos das nanopartículas de zeína contendo resveratrol em um modelo experimental de neuroinflamação.

2.2 Objetivos Específicos

- Comparar as ações do Resveratrol e das nanopartículas contendo Resveratrol na deposição de Beta Amilóide através da análise quantitativa para a Imunohistoquímica Anti Beta Amilóide, Anti Tau e CD68 na indução por Beta Amilóide1-42.
- Avaliar as citocinas pró e antiinflamatórias IL-10, IL-6, TnF- α e InF- δ através da citometria de fluxo no processo de neuroinflamação induzida por Toxina Beta amilóide.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 DOENÇA DE ALZHEIMER / NEUROINFLAMAÇÃO

Ao longo dos últimos anos a DA vem sendo estudada como uma denominação de disfunção neurodegenerativa, levando ao quadro de demência mais causal na população idosa, incluindo-se o de maior a morbimortalidade Brasil. Tem sido avaliado que a população acima de 65 anos vem aumentando e está havendo uma queda estatisticamente da população jovem (SAAD, 2010). A maioria dos pacientes com DA tem mais de 65 anos, e após este período o risco de desenvolvimento mais severo é dobrado a cada cinco anos (KULICHIKHIN *et al.*, 2021).

No estudo de Sandoval, Turra, Loschi, (2019), foi avaliado o índice populacional e regional no Brasil que verificaram na região sul e sudeste que se encontram indivíduos com a menor taxa de demência, sendo que estas regiões apresentam maior índice de desenvolvimento humano (IDH) quando comparado com as demais regiões. No ano de 2004, observou-se que cerca de 24 milhões de pessoas se depararam com algum tipo de demência. Acredita-se que nos países em desenvolvimento há uma margem de 60% da população idosa, as quais apresentam demência (FERRI *et al.*, 2005). Ainda estima-se que o número de pessoas vivendo no mundo com demência passe dos atuais 50 milhões para 152 milhões em 2050 (BAUGART *et al.*, 2015; BRASIL, 2017).

As exposições precoces aos fatores de risco podem aumentar as chances do desenvolvimento da doença, como aponta a Organização Mundial de Saúde (OMS). A média de vida da população apresentou um aumento, com isso, a demência e em particular o Alzheimer, destacam-se como um problema de saúde pública e preocupação social (FERNANDES; ANDRADE, 2017).

Após o diagnóstico da doença o tempo de sobrevivência varia em torno de 8,3 anos para indivíduos com 65 anos. Para o diagnóstico após os 90 anos verifica-se que esta estimativa de sobrevivência reduz para 3,4 anos. A sobrevivência de pessoas acometidas pela DA depende dos sintomas e da idade de início, que podem levar a uma redução da expectativa de vida em torno de 39% (TEIXEIRA *et al.*, 2015).

3.2 EPIDEMIOLOGIA

A DA é a principal causa de demência em idosos no ocidente, sendo uma doença neurodegenerativa progressiva que atinge cerca de 26 milhões de pessoas no mundo, com 4,6 milhões de novos casos por ano (CAIXETA, 2011). Segundo o relatório anual 2020 da Alzheimer's Association, 5,8 milhões de pessoas com 65 anos ou mais vivem com demência nos Estados Unidos em 2020, e acredita-se que este número pode chegar a 13,8 milhões em 2050 (KULICHIKHIN *et al.*, 2021)..

A DA é uma patologia de etiologia multifatorial, em que ocorre a neurodegeneração decorrente da formação de placas senis com o acúmulo da proteína beta amiloide A β e de emaranhados neurofibrilares, relacionados às alterações do estado de fosforilação da proteína tau no espaço intracelular cerebral (ARGILÉS *et al.*, 2010).

O declínio das funções cognitivas é caracterizado por alterações bioquímicas e estruturais, que ocorrem no cérebro dos pacientes acometidos, levando a perda neuronal, a degeneração das sinapses e comprometimento da neurotransmissão (THOMAS, 2008).

Para Luzardo, Gorini e Silva (2006) a DA afeta, inicialmente, a região da memória de curto prazo. Além da memória, a doença afeta a orientação, atenção, linguagem, capacidade para resolver problemas e habilidades para desempenhar as atividades da vida diária, levando em consideração a individualidade de cada idoso em relação aos estágios da DA, sendo possível caracterizar os estágios do processo demencial em leve, moderado e severo.

O estágio leve denominado por alguns autores como Comprometimento Cognitivo Leve (CCL) é considerado pela perda de memória recente, mudanças comportamentais, pouca perda de julgamentos, falhas na linguagem, depressão e apatia. Contudo o paciente desempenha suas atividades diárias com normalidade, não demonstrando grandes traços de demência. Nessa fase estima-se que o paciente tenha uma perda entre 40% e 60% no córtex entorrinal (LUZARDO; GORINI; SILVA, 2006).

No estágio moderado da doença faz-se necessário ajuda diária ao idoso por conta da perda de grande parte das funções cognitivas, elevadas alterações comportamentais e permanente perda de memória devido a uma grande deterioração no córtex entorrinal, no hipocampo, sistema límbico e córtex cerebral (LUZARDO; GORINI; SILVA, 2006).

O estágio final da DA é marcado pela perda total de capacidade de reconhecimento de pessoas e lugares, incapacidade para desempenho de funções gerais

e inabilidade para o autocuidado, sendo necessário haver um acompanhamento integral com o idoso. O óbito ocorre usualmente após vários anos do início dos sintomas, geralmente por pneumonia aspirativa ou infecção do trato urinário com sepse (AREZA-FEGYVERES *et al.*, 2007).

3.3 FISIOPATOLOGIA

A DA está ligada a redução do tecido cerebral no córtex e hipocampo com a perda neuronal, as mudanças neuronais estão bem relacionadas com os sintomas clínicos desta doença. Nos últimos anos várias pesquisas são feitas com o objetivo de chegar a conclusão do mecanismo fisiopatológico exato da DA. As vias estudadas de hipótese são: deposição de A β , emaranhados neurofibrilares, colinérgico, via de estresse glutaminérgico e oxidativo.

3.3.1 Hipótese de Cascata Amilóide

A DA atua de forma progressiva com acúmulo de A β , sendo este um fragmento gerado por ação proteolítica expressa pela proteína precursora amilóide (PPA). Como consequência catabólica normal da PPA, resulta um fragmento principalmente na região A₄₁ e A₄₂. Os emaranhados neurofibrilares estão ligados com a DA por ser um reflexo do envelhecer (SAWDA, MOUSSA, TURNER, 2017; CAO, PING, 2018).

Embora a DA precise ser mais elucidada devido à sua complexidade, linhas crescentes de evidência destacaram que o acúmulo de agregados de proteína A β é um dos eventos causadores na patogênese da DA e pode representar um alvo terapêutico eficaz para a piora do quadro da DA (SELKOE, HARDY, 2016; SEVIGNY *et al*, 2016; VOO, XIAO, MCFLHENY, 2018).

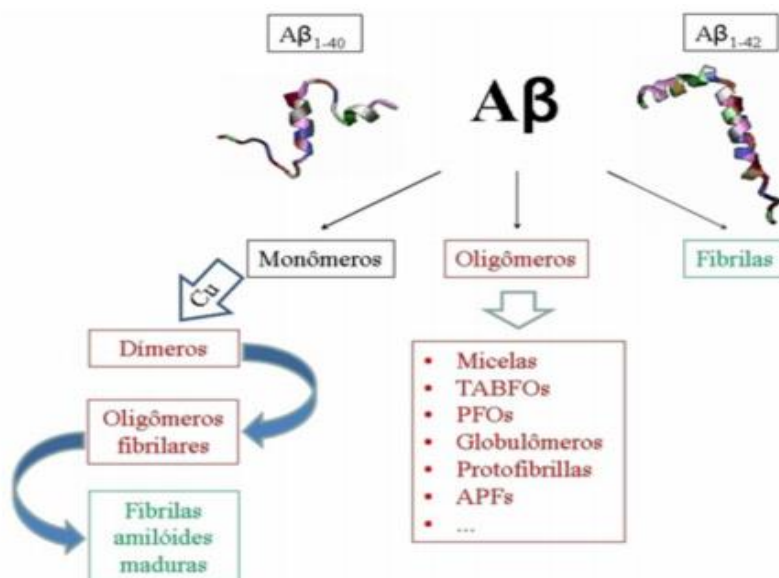
O peptídeo A β (38-43 aminoácidos), gerado por β e γ -secretases da proteína precursora de amilóide, Através do processo da clivagem pela enzima γ -secretase, sendo dentre estes fragmentos os mais comuns os de 40 (A β ₁₋₄₀) e 42 (A β ₁₋₄₂) encontrados como resíduos de aminoácidos.

A A β é produzida em indivíduos normais, mas, sob certas circunstâncias, esta molécula pode agregar anormalmente em várias isoformas tóxicas, incluindo

oligômeros, protofibrilas e fibrilas em sequência e por fim iniciar a progressão da DA (BEEG *et al.*, 2016; FERREIRA *et al.*, 2015).

O acúmulo desses agregados de proteína desencadeia neuroinflamação, estresse oxidativo e dano mitocondrial. Evidências emergentes sugerem que a patologia da DA pode resultar de uma interação complexa entre A β anormal e proteínas tau. De acordo com a "hipótese amilóide" da DA, o acúmulo de agregados A β no espaço extracelular dos neurônios no cérebro é a principal causa para conduzir a patogênese para neurodegeneração e declínio cognitivo em pacientes com DA (MUSIEK, HOLTZMAN, 2015).

Na figura 1, representa o esquema da hipótese da cascata amilóide com os monômeros, oligômeros e fibrilas juntamente com as agregações de 40 (A β_{1-40}) e 42 (A β_{1-42}).



Fonte: Falco *et al.*, 2016.

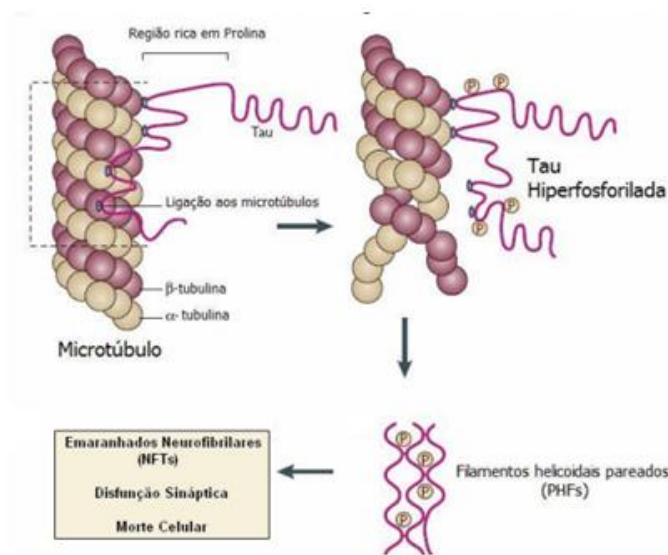
3.3.2 Hipótese de emaranhados neurofibrilares

Os emaranhados neurofibrilares podem ser observados no cérebro dos pacientes com DA, eles são filamentos insolúveis acumulados em neurônios degenerados. A proteína Tau, está associada ao microtúbulo que estabiliza o microtúbulos do neurônio para manter sua forma estrutural, citoesqueleto. Os microtúbulos altamente solúveis são o MAP1A, MAP1B e MAP2 os quais estão envolvidos na tubulina. O processo de fosforilização e desfosforilação está ligado com a proteína Tau e a sua associação com

os microtúbulos, este mecanismo ocorre como ação completamente reguladora (CRAFT *et al.*, 2004; TALBOT *et al.*, 2012; SALTMARCHE *et al.*, 2017).

O processo normal de fosforização da proteína Tau diminui a sua afinidade com a tubulina e a facilita a dissociação dos microtúbulos, diferentemente na hiperfosforilação que na DA começa principalmente no processo intracelular, causando uma falha estrutural e comprometendo a função sináptica e neuronal (CHAO *et al.*, 2019).

Figura 2, despolimerização dos microtúbulos e hiperfosforilação da tau. A proteína tau acaba gerando a estabilidade aos microtúbulos que promovem suporte aos neurônios.

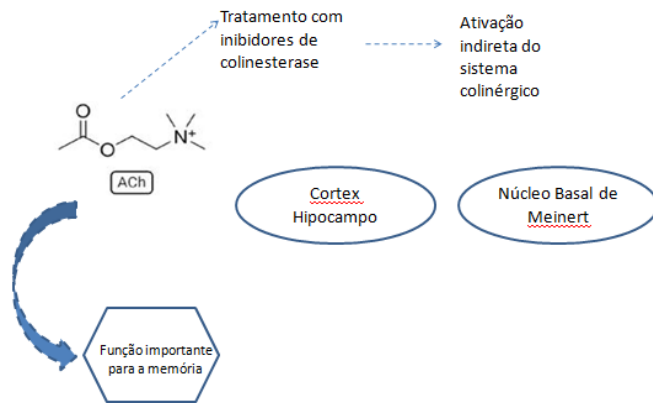


Fonte: Adaptado Hoppe, 2009.

3.3.3. Hipótese de deficiência colinérgica

Esta via de hipótese é a primeira e mais estudada em relação com a patogênese da DA, aos indivíduos acometidos pela doença ocorre uma diminuição de 30% a 90% da colina acetiltransferase a qual é uma enzima que sintetiza a acetilcolina (ACh). Este neurotransmissor é importante no processo de aprendizagem e memória, a diminuição colinérgica em encéfalo com DA está relacionado com a disfunção cognitiva. A redução de neurônios colinérgicos no cérebro doente pode resultar em um baixo nível de receptor de ACh (COPAS *et al.*, 2019; CHEN *et al.*, 2019).

Figura 3, representa a hipótese de deficiência colinérgica.



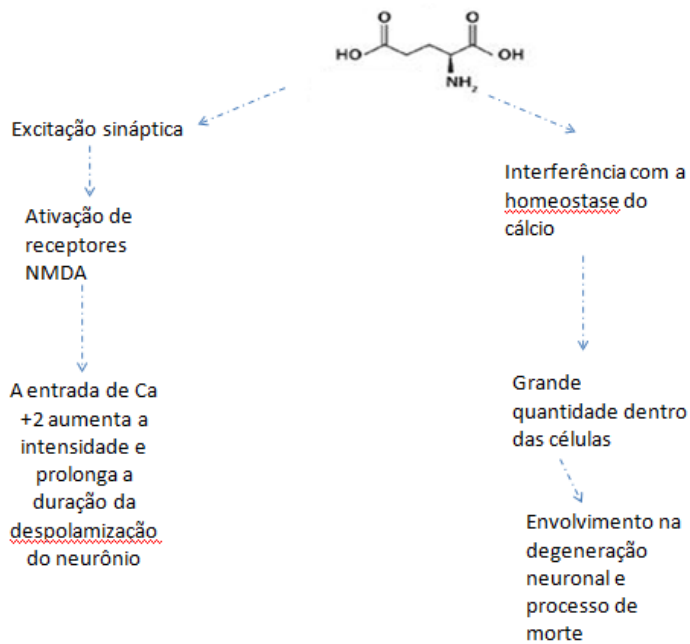
Fonte: Arquivo pessoal

3.3.4 Hipótese de Excitotoxicidade

Esta hipótese propõe que os neurônios são degenerados devido a neurotransmissão excitatória excessiva, assim como na DA e outras doenças neurodegenerativas agudas ou crônicas. A perda de neurônios pode ser decorrente de uma excessiva excitação sináptica mediada pelo aminoácido glutamato (SELKOE, HARDY, 2016).

A atividade glutamatérgica excessiva desencadeia a abertura dos canais de íons de cálcio e um influxo extremo destes íons no neurônio o que resultam em danos nas organelas e neuronais levando a morte do neurônio. O aumento do influxo de íons de cálcio leva a morte neuronal por vários mecanismos incluindo dano mitocondrial, ação de radicais livres, inibindo assim a síntese de proteínas por ativação de fosfolipases e proteínas quinases (KERPPERS *et al.*, 2020).

Figura 4, esquema da hipótese de excitotoxicidade.



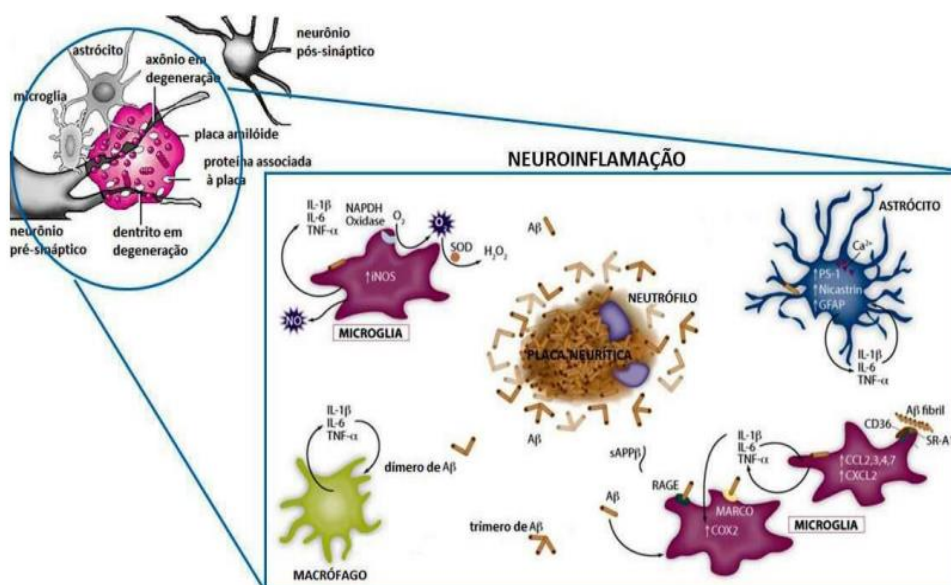
Fonte: Arquivo pessoal

3.3.5. Hipótese Inflamação, estresse oxidativo e disfunção mitocondrial

Algumas marcas na DA pode ser percebida incluindo o estresse oxidativo (OS), inflamação e a disfunção mitocondrial através do alto consumo de oxigênio o cérebro se torna vulnerável a desenvolver o OS.

As Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e as Espécies Reativo de Nitrogênio (RNS) são sintetizadas nas células normais como resultado da própria resposta fisiológica e esses radicais livres são efetivamente neuralizados com a ação dos antioxidantes. Com a quantidade excessiva de EROs ou radicais livres elevam a uma peroxidação lipídica e apoptose molecular dos neurônios, causando danos irreversíveis (KERPPERS *et al.*, 2020; LIAO *et al.*, 2012). Nos indivíduos com a DA o estresse oxidativo causa danos neuronais por facilitar a formação de NFTs e o desenvolvimento de placa amilóide (PURUSHOTHUMAN *et al.*, 2014).

Figura 5, processo de neuroinflamação com ativação da micróglia, astrócitos, mastócitos.



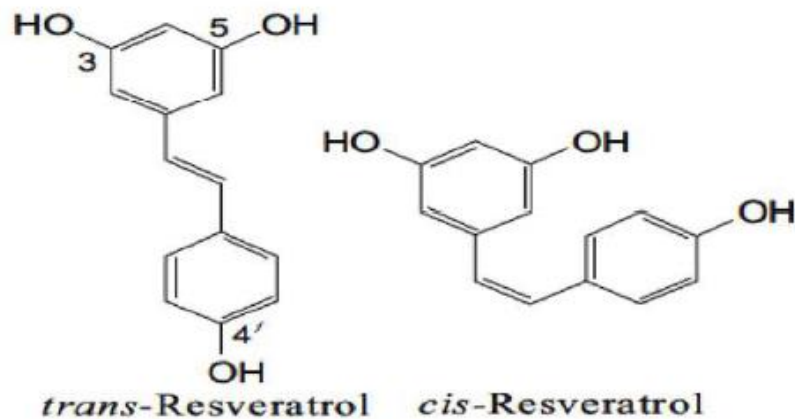
Fonte: Viegas *et al.*,2011.

O processo inflamatório se dá através de um conjunto de reações complexas nos tecidos vascularizados, sendo uma resposta à ação de agentes nocivos trazendo injúrias ou danos teciduais, manifestações por migração celular, ativação de leucócitos e reações sistêmicas diversas. Sendo assim, este tipo de resposta pode ocorrer no Sistema Nervoso Central denominando-se a neuroinflamação. Nos últimos anos, fortes evidências na progressão e severidade da DA estão relacionados juntamente com os mecanismos de ativação do sistema imune, ação inflamatória como a micróglia e astrócitos (VIEGA *et al.*,2011).

3.4 RESVERATROL

O Resveratrol é um polifenol vegetal apesar de apresentar dois tipos de isômeros a forma estável e mais ativa do composto é a (*trans*-3,4',5 trihidroxitransetilbeno), com peso molecular de 228,24 g/mol (ADRIAN, 2012). De acordo com a Farmacopeia Europeia, este polifenol não flavonoide possui uma solubilidade de aproximadamente 50mg.mL em etanol, 16mg.mL em DMSO, apresentando solubilidade limitada em água. Sua solubilidade em água é de 3mg/100ml, sendo solúvel em solventes orgânicos como etanol, DMSO e dimetilformamida, seu pH é de 7,2, seu espectro UV pode variar de 218 a 320 nm (FARMACOPEIA EUROPÉIA, 2017).

Figura 6, estruturas químicas do *trans*-resveratrol e do *cis*-resveratrol.



Fonte: Rege *et al.*, 2014.

O resveratrol é encontrado principalmente em espécies de videira (*Vitis* sp.), suco de uva (*Vitis* *Vitaceae* *Vinifera*) e vinho. Também pode ser encontrado em outras fontes de alimentos como: banana (*Musaceae* *Musa* sp.), amendoim (*Fabaceae* *Arachis* *hypogaea*), romã (*Punicaceae* *Punica* *granatum*), espinafre (*Amaranthaceae* *Spinacia* *oleracea*), e apresenta resultados importantes na DA como atenuação desta, chamando a atenção por suas ações como antiinflamatório, antioxidante, antitumorais e neuroprotetor (ADRIAN, 2012).

O resveratrol que age na modulação da neuropatologia da A β inibindo sua geração, há também o fenômeno da oligomerização anormal de A β e a reversão do quadro de degeneração neurofibrilar que se dá pela agregação da proteína Tau. A ação como neuroprotetor, visa a inibição do fator nuclear Kappa B (NF- κ B) e a alteração nas vias de sinalização das proteínas cinases ativadas por mitogênio (P38-MAPK), quinase 1/2 regulada por sinal extracelular (ERK1 / 2) e fosfoinositida 3-quinase (PI3K) / Akt, ativação de autofagia, entre outros (CAVALCANTI, ENGELHARDT, 2012; PASINETTI, WANG, HO, ROLES, 2015).

Alguns polifenóis de certos vinhos tinto realizam a inibição da agregação de A β , outros por sua vez já não apresentam esta mesma capacidade, sendo que os mecanismos de A β e tau são importantes para a DA como principais biomarcadores (FROZZA *et al.*, 2010).

A ação do sistema de regulação de informação silenciosa-1 (SIRT1) como resposta neuroprotetora do resveratrol, impede que haja morte da micróglia por ação do

A β , melhorando a função cognitiva (GUIDA *et al.*, 2015). Além disso, podem ainda ser encontradas regulação das espécies reativas de oxigênio (EROs), óxido nítrico (NO) produção de citocinas pró-inflamatórias e expressão de A β no cérebro de pacientes com DA (SEVIGNY *et al.*, 2016; BARROS *et al.*, 2017).

Sharma *et al.*, (2007) relataram no estudo que os macrófagos, que se desenvolvem a partir de monócitos são fundamentais durante o início e resolução da inflamação e eles se diferenciam em subconjuntos específicos de tecido. O óxido nítrico (NO) e a PGE2 são marcas registradas da inflamação aguda e crônica em macrófagos pró-inflamatórios. Os EROs prejudicam a produção de NO dependente de iNOS em macrófagos e exerce fortes efeitos inibitórios sobre PGE2. Desta forma, atende claramente aos critérios de um nutriente antiinflamatório, visto que a produção e a expressão de citocinas incluindo TNF- α e as IL-1 β e IL-6 pró-inflamatórias foram prejudicadas pelo RES, sugerindo que ele atenuou a ativação clássica de macrófagos. Com relação às CKs, o Resveratrol embotou CCL4 / MIP-1 β e CCL5/ RANTES e, portanto, o recrutamento de monócitos e linfócitos T ativados, respectivamente. Notavelmente, o GM-CSF, um fator de crescimento e diferenciação para macrófagos pró-inflamatórios foi fortemente diminuído pelo Resveratrol.

Embora seus importantes efeitos celulares sejam promissores para a DA, o uso clínico do resveratrol por via oral é um desafio, devido a sua baixa solubilidade aquosa dificultando a biodisponibilidade oral. Desta forma, a nanotecnologia pode resolver esse problema e permitir o uso eficaz do resveratrol como medicamento. As nanopartículas orgânicas são sistemas coloidais compostos por materiais naturais ou sintéticos em escala nanométrica. As nanopartículas promovem a melhoria das características físico-químicas do fármaco, modulando os aspectos farmacocinéticos e farmacodinâmicos. Além disso, a nanoencapsulação promove a administração prolongada e direcionada do medicamento, resultando em uma terapêutica mais específica e redução dos efeitos adversos (LIMA *et al.*, 2018).

Outro ponto importante vinculado ao resveratrol é a sua capacidade de modular a SIRT1 que ocorre em doenças neurodegenerativas como é o caso da DA (TELLONE, 2015). Desta forma, o SIRT1 realiza a regulação de alguns substratos, dentre eles o p 53 e o co-ativador receptor gama ativado pelo peroxissomo 1 α (PGC-1 α). Percebe-se uma diminuição de aglomerados de A β , resultando em recuperação da atividade mitocondrial (HIGASHIDA *et al.*, 2018). O estudo de Rege *et al.*, (2015) avaliou a ação neuroprotetora do Resveratrol através do estresse oxidativo induzido pelo A β sendo

uma pesquisa *in vitro*, e observaram que o Resveratrol apresenta uma tripla ação nomeada dessa forma pelo autor como: inibição da auto indução $A\beta_{1-42}$ agregação, antioxidação e atividade quelante de metais.

3.5 NANOTECNOLOGIA

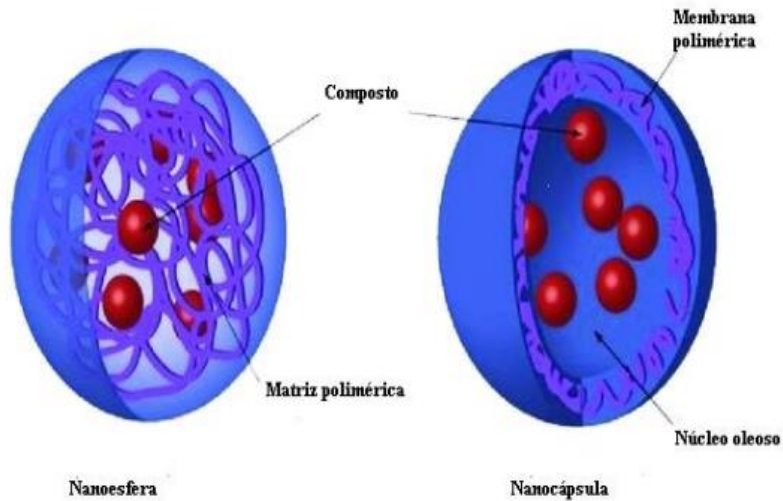
3.5.1 Nanopartículas

A composição das nanopartículas influencia sua biodegradabilidade, perfil de liberação e aspectos de segurança. Nanopartículas de proteínas, têm sido estudadas devido a sua biodegradabilidade e as de fontes renováveis são valiosas. A zeína é uma proteína vegetal obtida do endosperma de grãos de milho e é um material com potencial para formar nanopartículas destinadas a aplicação oral (PAULUK *et al.*, 2019).

O termo “Nanopartícula” aplicado literalmente compreende uma partícula que, independentemente da sua constituição, forma tipos de interações e aplicações e apresenta um tamanho nanométrico. Segundo a EFSA (European Food Safety Authority), qualquer nanomaterial, em inglês ENM (engineered nanomaterial), é definido como um material produzido que seja composto por partes estruturais e funcionais discretas, que possuam mais de uma dimensão e cujo tamanho seja inferior a 100 nm (European Food Safety Authority, 2009). No entanto, na comunidade científica e em específico em ciências farmacêuticas o termo é utilizado para descrever partículas que nem sempre se enquadram nesta definição mais estrita. Existe ainda uma necessidade de esclarecer a sua definição. Esta confusão não facilita a pesquisa deste tema, pois os termos microcápsulas e microesferas são, geralmente, associados ao tema, embora não se encontrem dentro da definição literal.

Existe um vasto número de nanopartículas com as mais diversas aplicações em várias áreas. No setor farmacêutico as nanopartículas não se encontram categorizadas nem apresentam uma definição concreta. No entanto, trataremos as nanopartículas como qualquer material ou partícula coloidal, farmacologicamente ativo ou inerte com a capacidade de veicular agentes terapêuticos, que se encontre no intervalo nanométrico de 10 a 1000 nm (1 μm). Nesta definição estão enquadrados os complexos de inclusão, os lipossomas, as nanoemulsões, as nanocápsulas e nanoesferas, as nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) e vetores lipídicos nanoestruturados (NLC), os conjugados fármaco-lipídeo (LDC), as nanopartículas magnéticas, e os quantum dots (QD).

Figura 7, Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas.



Fonte: Pauluk *et al.*, 2019.

As nanopartículas já são vistas em ciências da saúde, como capazes de revolucionar os métodos de diagnóstico e tratamentos atuais. A capacidade que apresentam de modificar as propriedades do fármaco que veiculam, de aumentar a estabilidade de fármacos, de permitir diversos perfis de liberação do mesmo, e de apresentar especificidade para certos tecidos, torna-as ferramentas essenciais para o desenvolvimento de sistemas de veiculação mais eficazes, com menos frequência de tomadas e com menos efeitos adversos, assim como para o desenvolvimento de técnicas de análise de amostras biológicas e técnicas de imagiologia mais eficientes (CAR *et al.*, 2012).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Materiais

Trata-se de um estudo experimental, descritivo e observacional sendo realizado no laboratório de Neuroanatomia da Universidade Estadual do Centro Oeste (UNICENTRO) com aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da mesma instituição, protocolo número 031/2019.

4.2 Amostra

Foi composta por 30 animais, da raça *RattusNorvegicus*, linhagem Wistar, machos, pesando entre 200-250 gramas. Foram mantidos 4 animais por gaiolas, confeccionadas em acrílico, inquebrável e lavável. As gaiolas com os animais que foram inseridos em prateleira receberam a alimentação, ração e água ad *libitum*, mantidos em sala sob o ciclo claro/escuro de 12 horas (luzes ligadas de 7 h às 19 h) em temperatura de 23 ± 1 °C, controlado por ar condicionado sprint 7000BTU's.

4.3 Grupo experimental

Os animais foram divididos em cinco grupos:

Grupo Controle (C): Constituído por 6 animais para ensaios da predominância dos tecidos normais.

Grupo controle Positivo (CP): Foi composto por 6 animais com lesão na área CA1 por beta amilóide₁₋₄₂, sem tratamento e com coleta de material e eutanásia no trigésimo dia após a lesão.

Grupo Experimental Nanopartícula Branca (NB): Foi composto por 6 animais com lesão na área CA1 por beta amilóide₁₋₄₂, e tratados com 50 mg/Kg de Nanopartículas Brancas dissolvida em salina 0,9%, por gavagem durante 15 dias e com coleta de material e eutanásia no trigésimo dia após a lesão.

Grupo Experimental Resveratrol (R): Foi composto por 6 animais com lesão na área CA1 por beta amilóide₁₋₄₂ e tratados com 50 mg/Kg de Resveratrol dissolvida em salina 0,9%, por gavagem durante 15 dias e com coleta de material e eutanásia no trigésimo dia após a lesão.

Grupo Experimental Nanopartículas de Resveratrol (NR): Foi composto por 6 animais com lesão na área CA1 por beta amilóide₁₋₄₂ e tratados com nanopartículas de Resveratrol na concentração de 50 mg/kg, dissolvida em salina a 0,9%, por gavagem durante 15 dias, e com coleta de material e eutanásia no trigésimo dia após a lesão.

4.4 Preparação A β 1-42

Um miligrama do peptídeo β -amilóide (Sigma-Aldrich) foi dissolvido em água Milli-Q filtrada (0,2 μ M) e esta solução estoque foi armazenada a -20°C. Para obter o peptídeo em seu estado fibrilado, as alíquotas da solução estoque foram descongeladas e mantidas a temperatura de 37°C durante 72 horas (SHENGQUAN *et al.*, 2020).

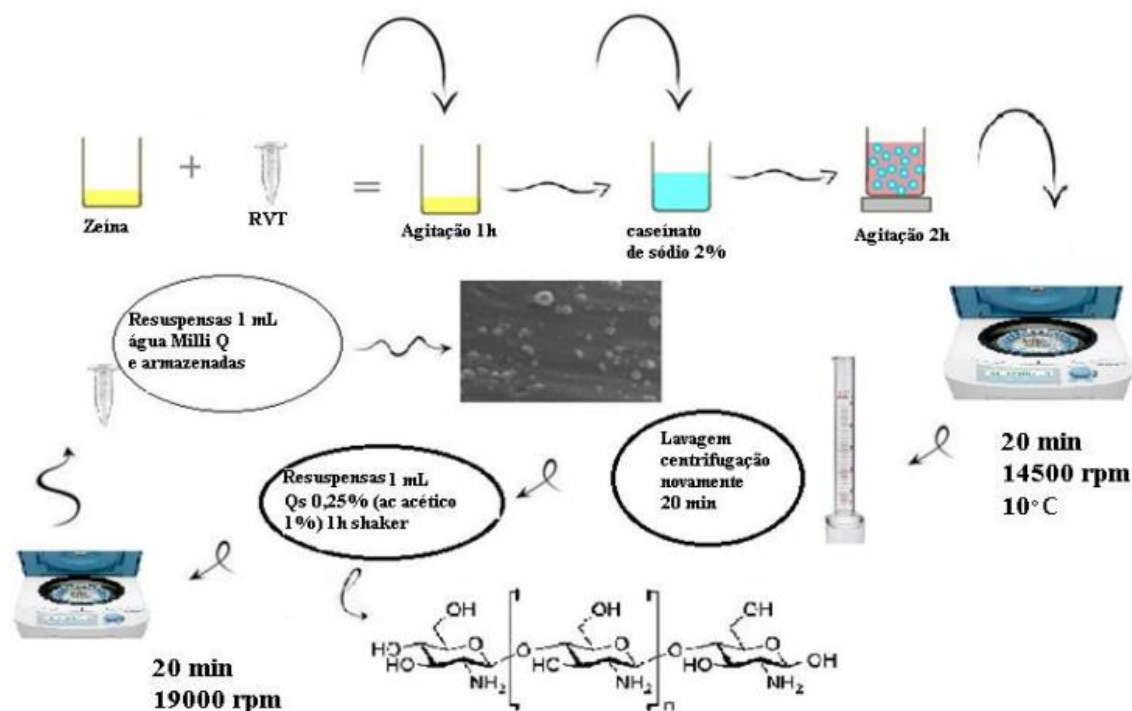
4.5 Nanopartículas de Resveratrol

4.5.6 Preparação nanopartículas

As nanopartículas de zeína foram obtidas pelo método de dispersão líquido-líquido, conforme descrito por Zhong e Jim (2009). Resumidamente, 60 mg de zeína e 10 mg de resveratrol foram pesados e dissolvidos em 3 mL de mistura de etanol / água (85:15, v/v) e mantidos sob agitação magnética (600 rpm) a temperatura ambiente por 1 h. As nanopartículas foram produzidas pela adição gota a gota da fase etanólica em 9 mL de uma fase aquosa contendo caseinato de sódio a 2%, usado como estabilizador.

A mistura foi mantida sob agitação (600 rpm) por 2h. Em seguida, as nanopartículas foram ultracentrifugadas a 25151g, 25°C, por 20 min (Z36HK HermleWehingen, BH, Alemanha). O sobrenadante foi reservado para análise quantitativa de resveratrol não encapsulado. Para o processo de revestimento das nanopartículas com quitosana, o precipitado foi ressuspense em 1 mL de solução de quitosana 0,25% (previamente preparada em ácido acético 1%) e transferido para uma incubadora agitadora por 1 h a 200 rpm, em temperatura ambiente. Finalmente, a dispersão das nanopartículas foi ultracentrifugada por 20 min, 25°C a 25151ge o precipitado resultante foi suspenso em água. As nanopartículas descarregadas foram preparadas conforme descrito acima, exceto pela adição de resveratrol.

Figura 7, esquema das nanopartículas de resveratrol.



Fonte: Pauluk *et al.*, 2019.

4.5.7 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). Para as análises, uma alíquota de suspensões de nanopartículas foi coletada antes da incubação com quitosana e após a incubação para posterior comparação de tamanho e PDI. 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 659 nm.

4.5.8 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 1 mM KCl e colocadas em uma célula eletroforética a 25°C sob o potencial de ± 150 mV

(ZetaSizer ZS, Malvern, UK). O potencial zeta foi analisado antes e após a incubação das nanopartículas com quitosana. As medidas foram realizadas em triplicata e expressas como média \pm desvio padrão.

4.5.9 Determinação da eficiência de encapsulamento (EE)

Para determinar a quantidade de resveratrol 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 pH 6,8 e acetonitrila (63:30:7, v/v/v) com vazão de 0,9 mL / min. O detector de PDA foi ajustado para 306 nm. A porcentagem de EE foi determinada em pelo menos três repetições, conforme Equação (1). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão.

Equação 1

$\% \text{ EE} = (\text{quantidade inicial do medicamento} - (\text{quantidade recuperada} / \text{quantidade inicial do medicamento})) \times 100$

4.6 Cirurgia Experimental

Os animais foram anestesiados com uma solução na proporção de 80 mg/kg de Cloridrato de Cetamina (Ketamina, frasco de 10ml) para 15 mg/kg de Cloridrato de Xilasina (Dopaser, frasco de 10ml) via intraperitoneal e levados a um aparelho estereotáxico (David Kopf, EUA), onde suas cabeças foram fixadas pelo rochedo temporal e incisivos superiores. Dessa forma, foram posicionados segundo as coordenadas AP= -3.0 mm, ML= \pm 1.6 mm e -1.6 mm, e DV= 3.0 mm, inclinação latero-lateral = 0°, respectivamente, tomando-se o bregma como referência, estando às suturas lambdóide e bregmática em um mesmo plano horizontal.

Após receberam a toxina Beta-Amilóide₁₋₄₂ (Sigma-Aldrich) através de seringa de Halmiton de 10 μ L, foram injetados 4 μ L na região hipocampal de CA1 durante 10 minutos.

Depois da indução com toxina beta Amilóide os animais ficaram em descanso por um período de 30 dias para que ocorressem os processos inflamatórios e neurodegenerativos dos neurônios hipocámpicos.

4.6.1 Analgesia pós cirúrgica

Para a analgesia pós cirúrgica, foi utilizado o cloridrato de tramadol na dose de 10 mg/kg, a cada 12 horas, por via oral durante sete dias.

4.6.2 Tratamento

Para o tratamento cada grupo recebeu por gavagem 0,5 ml com 10 mg de Resveratrol, nanopartículas contendo Resveratrol e o grupo NB somente as nanopartículas vazias no mesmo volume, por um período de 15 dias, após jejum de 12 horas durante à noite. A aplicação via oral foi realizada cuidadosamente sempre no mesmo horário no período da manhã. Após o processo os animais mantiveram-se por quatro horas apenas com a ingestão de água, a partir disso, os animais voltaram à alimentação normal.

4.6.3 Eutanásia

Os animais foram anestesiados com 80 mg/kg de Ketamina e 15 mg/kg de Xilazina. Depois de verificado o estado anestésico, os mesmos receberam 175 mg/kg de Pentobarbital por via intraperitoneal.

4.6.4 Decapitação

A decapitação e subsequente remoção do cérebro foram realizadas após a eutanásia dos animais, em seguida a região ventricular lateral juntamente com o hipocampo foram colocados em formalina a 15%, sendo mantidas por sete dias e levada as amostra para o laboratório de patologia.

4.6.5 Análise Histológica

As amostras foram cortadas em fatias de 2 micrômetros, incorporadas em parafina e coradas com Hematoxilina e Eosina. O processo da histologia foi realizado através do microscópio Olympus CX31 com UIS (universal Corrected Infinito) sistema óptico com 5 megapixels de cor digital DP 25 câmara, sendo fotografada com resolução de 1280x 960 e posteriormente salvo em JPEG.

4.6.6 Análise Imunohistoquímica

Para a realização da técnica de imunohistoquímica (IHQ), foram confeccionadas lâminas conforme descrito para análise histológica, contendo dois cortes por lâmina, por grupo experimental. A desparafinação térmica foi realizada por 16 horas em estufa a 60°C. Posteriormente, foi realizada a desparafinação química, por meio de 02 banhos de imersão em Xylol p ou 10'cada e um banho de imersão em álcool a 70 ° por mais 10'. Após banho-maria as lâminas foram imersas em solução de Citrato de Sódio em recipiente fechado e colocadas em banho-maria por 30 'para recuperação antigênica.

A marcação de campo foi realizada conforme descrito por Panis *et al.*, (2010) os cortes foram delimitados com caneta hidrofóbica Dako Pen® e as peroxidases endógenas bloqueadas em solução de peróxido de hidrogênio a 10% por 30 minutos, seguido de bloqueio de ligação inespecífica por incubação em soro fetal 0,1% por 1 hora.

Posteriormente, os cortes foram incubados com os anticorpos primários da marca Santa Cruz Biotech, Anti Amilóide Beta (1: 300), Anti CD68 e Anti Tau (1: 300) em câmara úmida noturna a 4 °C por 2 horas. Após a incubação, as lâminas foram submetidas a 3 banhos (5 minutos) em PBS e a seguir incubadas com anticorpo secundário e mantidas por 15 minutos. Novamente lavado com PBS em um jato e mais três lavagens com gota de PBS.

A marcação foi revelada pela incubação com 3,30-diaminobenzidina por 15 minutos, seguida de duas lavagens com PBS, o primeiro jato e a segunda gota. No último estágio, as seções foram levemente coloridas com hematoxilina de Harry (Merck) por 30 segundos e depois lavadas em água corrente.

Incubado em álcool a 70 ° por 5 'em banho de imersão. Incubado em álcool a 95 ° por 5' em banho de imersão. Incubado em Xilol por 5 'e incubado novamente em Xilol

por 10'. Após a drenagem de todo o líquido, as lâminas foram montadas com o bálsamo canadense e a lamínula.

4.6.7 Citometria de Fluxo

Foram coletados dois mL de sangue de cada animal posteriormente foi centrifugado a 1500 rpm por 10 min em temperatura ambiente. Após a centrifugação o sobrenadante (soro) foi pipetado e separado para análise. O kit utilizado para a análise foi BD™ Cytometric Bead Array Mouse Inflammation Cytokine Kit (Becton Dickinson, USA) as citocinas analisadas foram TNF; INF- γ ; IL-6; IL-10.

De acordo com as instruções do fabricante e analisadas no Citômetro de Fluxo BD™ Accuri C6 (Becton Dickinson, EUA), foram adicionados em cada amostra 10 μ L de cada reagente. Após este procedimento foi colocado em um eppendorf de 1,5 mL para cada amostra, 50 μ L dos beads das citocinas, 50 μ L da amostra (soro), 50 μ L de reagente de detecção; os tubos foram colocados no escuro por duas horas em temperatura ambiente. Após as duas horas, foi adicionado 1mL do tampão de lavagem em cada eppendorf e centrifugados a 200g, 4°C, por 5 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi cuidadosamente removido e descartado de cada amostra, e em seguida foram adicionados 300 μ L do tampão de lavagem em cada tubo para ressuspender as amostras.

A leitura no citômetro foi realizada manualmente por meio da aquisição de 10.000 eventos de cada amostra. Os dados da citometria de fluxo foram analisados no software FCap 3.0 Array (Becton Dickinson, EUA) e os resultados foram plotados em gráficos de médias e desvios-padrão da média.

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram dispostos em planilhas, analisados pelo software Prism 7.0. Para análise de distribuição normal foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk. Após a análise dos valores nas planilhas este obtiveram uma distribuição não normal, sendo utilizado teste de Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn's.

6. RESULTADOS

Os resultados mostrados na Tabela 1 indicam que o tamanho das partículas que ocorreu variação de $206.8 \pm 4.7\text{nm}$. Diversos fatores podem influenciar o tamanho das partículas, incluindo os componentes da formulação (tensoativo, características do fármaco) e técnicas de produção (temperatura, tempo, equipamentos) (MARCATO *et al.*, 2009; SHAHUL *et al.*, 2014).

Tabela 1, características das nanopartículas Resveratrol-Quitozana/zeína NP.

Características	Resultados (Média±DP)
Tamanho da Partícula (nm)	206.8 ± 4.7
Índice de Polidispersão	0.172 ± 0.16
Potencial Zeta (mV)	$+30.00 \pm 0.33$
Eficiência (%)	59.62 ± 7.31

DP = Desvio Padrão (n = 10).

O índice de polidispersão (PDI) é um parâmetro útil para medir a homogeneidade da distribuição do diâmetro de todas as partículas presentes na formulação, sendo que o PDI considerado ideal para um sistema monodisperso é zero e inferior a 0.3 para sistemas polidispersos (JAWAHAR *et al.*, 2012). O valor encontrado para as formulações ocorreu variação de 0.172 ± 0.16 , o que significa que a formulação preparada se apresentou como um sistema ligeiramente polidisperso.

O potencial zeta proporciona o índice da magnitude de repulsão eletrostática das partículas. É um parâmetro usado para determinação da estabilidade física de sistemas coloidais, por meio da medida da carga elétrica na superfície da partícula (SURENDER; DEEPIKA, 2016). Na Tabela 1 é observado que o potencial zeta das formulações variou de $+30.00 \pm 0.33\text{mV}$. A porcentagem da eficiência de encapsulação (%EE) foi calculada pela equação 1 e o valor obtido foi 59.62 ± 7.31 .

A análise qualitativa da imunomarcação para o peptídeo Anti-Beta Amilóide revelou, no grupo resveratrol, deposição de $A\beta$ ao redor do corpo celular dos neurônios de forma leve (Figura 8). Observou-se no grupo nanopartículas brancas (NB) deposição

de A β de forma moderada. No grupo controle positivo (CP) houve deposição de A β na região CA1 ao redor do neurônio e proliferação endotelial figura 8.

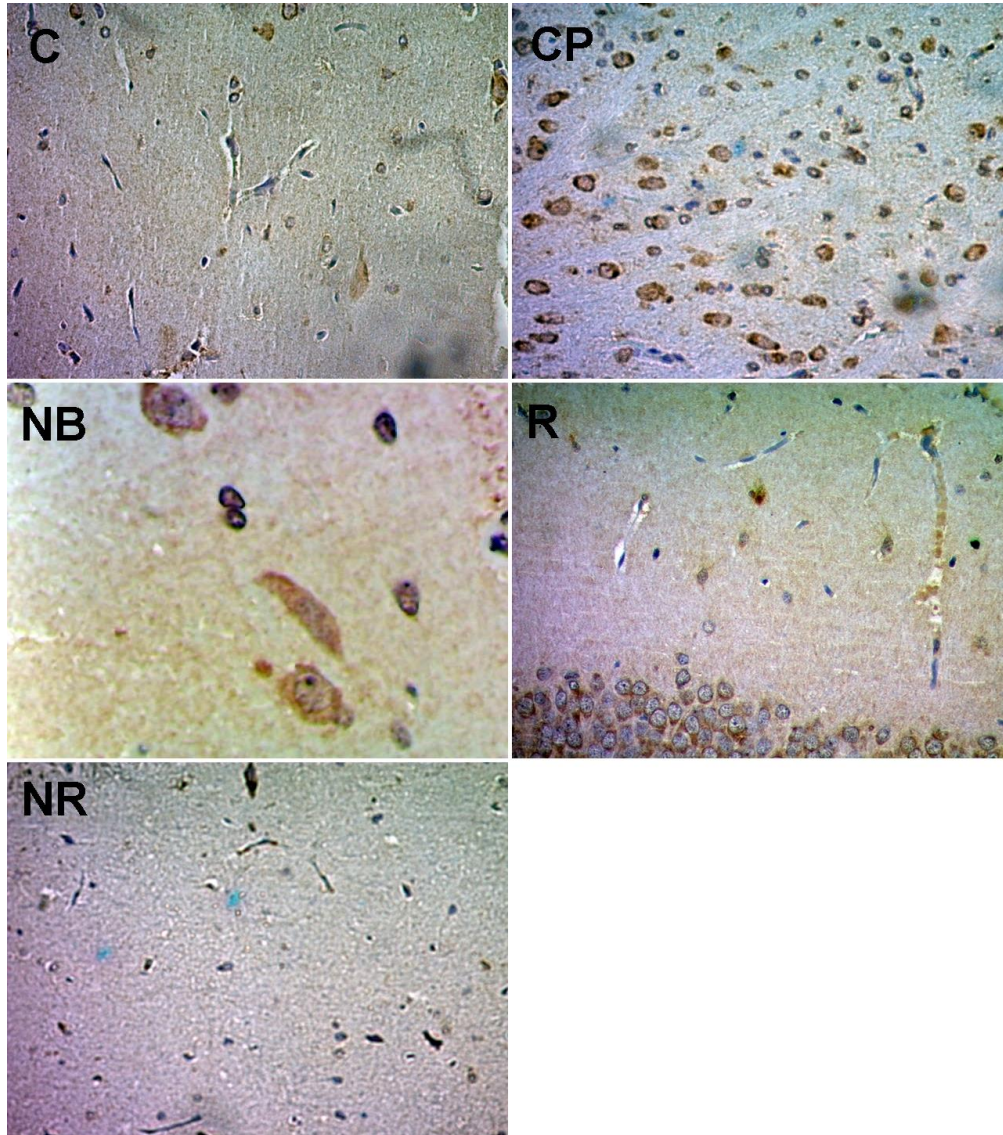


Figura 8. Análise imunohistoquímica para marcador Anti- Beta Amilóide, sendo a coluna à esquerda com aumento de 4x, com o NR não foram presenciadas alterações morfológicas, sendo que no CP observa-se a deposição de Beta amilóide na região de CA 1, no grupo NB encontram-se a presença de Beta Amilóide, já para o verificou-se a presença de Beta Amilóide ao redor dos neurônios.

Realizou-se também a quantificação dos níveis de marcação de Beta amilóide. O gráfico 1 mostra uma imagem representativa da quantificação obtida para a presença de A β nos grupos. Os grupos CP e R apresentaram significância estatística ($p < 0.005$) quando comparados ao NR.

Anti Beta Amiloide

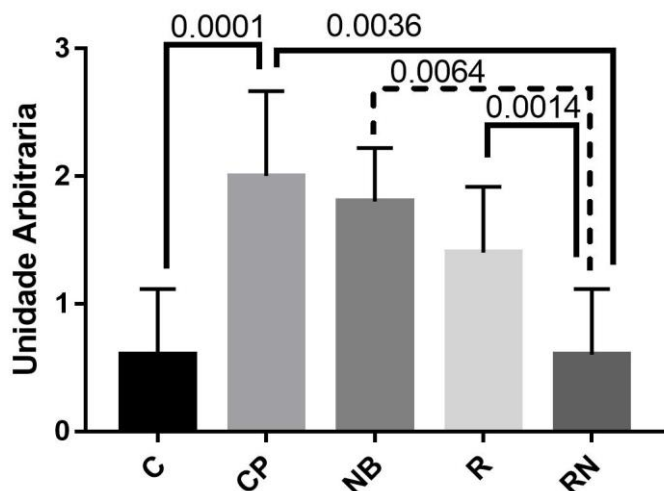


Gráfico 1. Análise quantitativa do marcador Anti Beta-Amiloide, no grupo C e CP apresentaram diferença estatística sendo ($p=0.0001$), também entre os grupos CP e NR encontra-se ($p=0.0036$) apresentando significância.

Avaliou-se utilizando Anti-Tau (Figura 9), que pode ser visto na coloração marrom sobre o axônio da região do hipocampo no grupo CN seu aspecto de depósito na região de CA1 e na lâmina supra-piramidal. Também foi observado no grupo NB aspectos da proteína Tau ao redor dos axônios e ao redor do corpo celular dos neurônios. Quando analisado no grupo NR, nota-se que a proteína Tau depositada de forma normal sobre a projeção do axônio, observando que a mesma em alguns neurônios está ao redor do corpo celular, porém, não modificando a estrutura celular. E no grupo tratado somente com Resveratrol foram reveladas alterações morfológicas dos núcleos dos neurônios, muitos deles não apresentando núcleo.

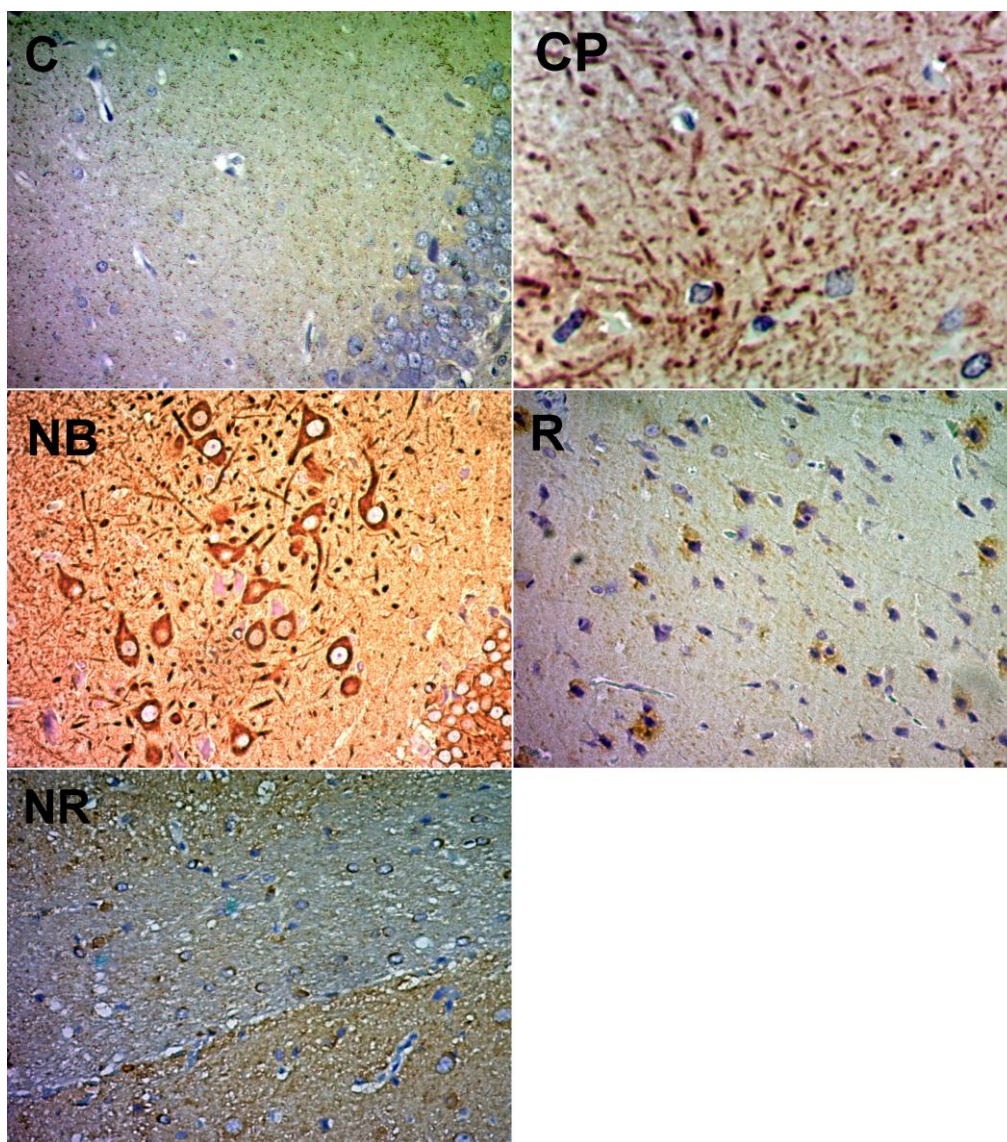


Figura 9. Análise imunohistoquímica de proteína Tau sendo a coluna à esquerda com aumento de 4x e a direita em 40x, conforme as demarcações nos grupos CP, NB, R e NR, pode-se perceber sua deposição, sendo que o no NR à projeção de taurina de forma normal, diferentemente dos grupos NB, CP que nota-se ao redor do corpo neuronal já o grupo R claramente percebe-se modificações no núcleo dos neurônios.

Observou-se a quantificação dos níveis de marcação da proteína Tau, demonstrada no gráfico 2, mostrou que a quantificação dos níveis de marcação foi semelhante entre os grupos C e RN (0.4 ± 0.51 e 0.6 ± 0.51), com coeficiente de variação de 129.1% e 86.07%. A análise estatística das quantificações demonstrou que existe diferença estatística entre os grupos CN e NR ($p=0.0001$) e entre CN e R ($p=0.0074$).

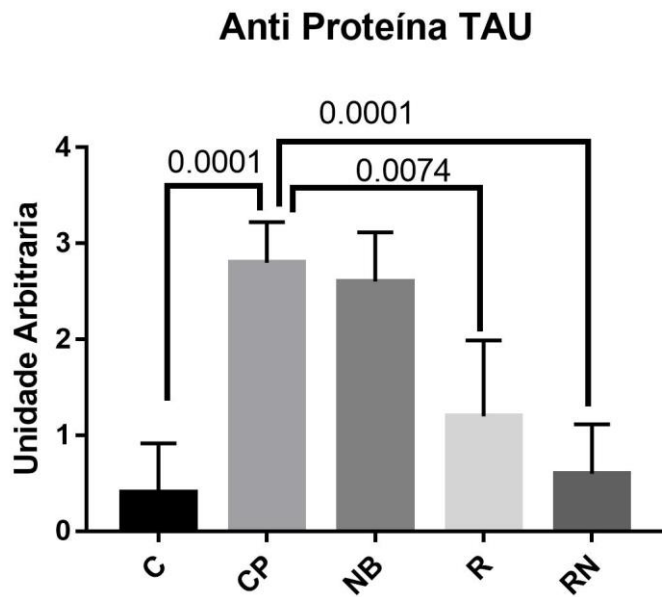


Gráfico 2. Análise quantitativa para Anti Tau, com diferença significativa entre o CN e NR ($p=0.0001$) e entre PC e R ($p=0.0074$).

Foi realizada a imunohistoquímica para CD68, biomarcador de micróglia, células de defesa (macrófago encefálico) conforme mostrado na Figura 10. No grupo C e NR não ocorreu ativação da micróglia, enquanto no grupo CP foram observados ativação. Já na imunomarcção no grupo R revelou ativação da micróglia o que aponta um processo inflamatório.

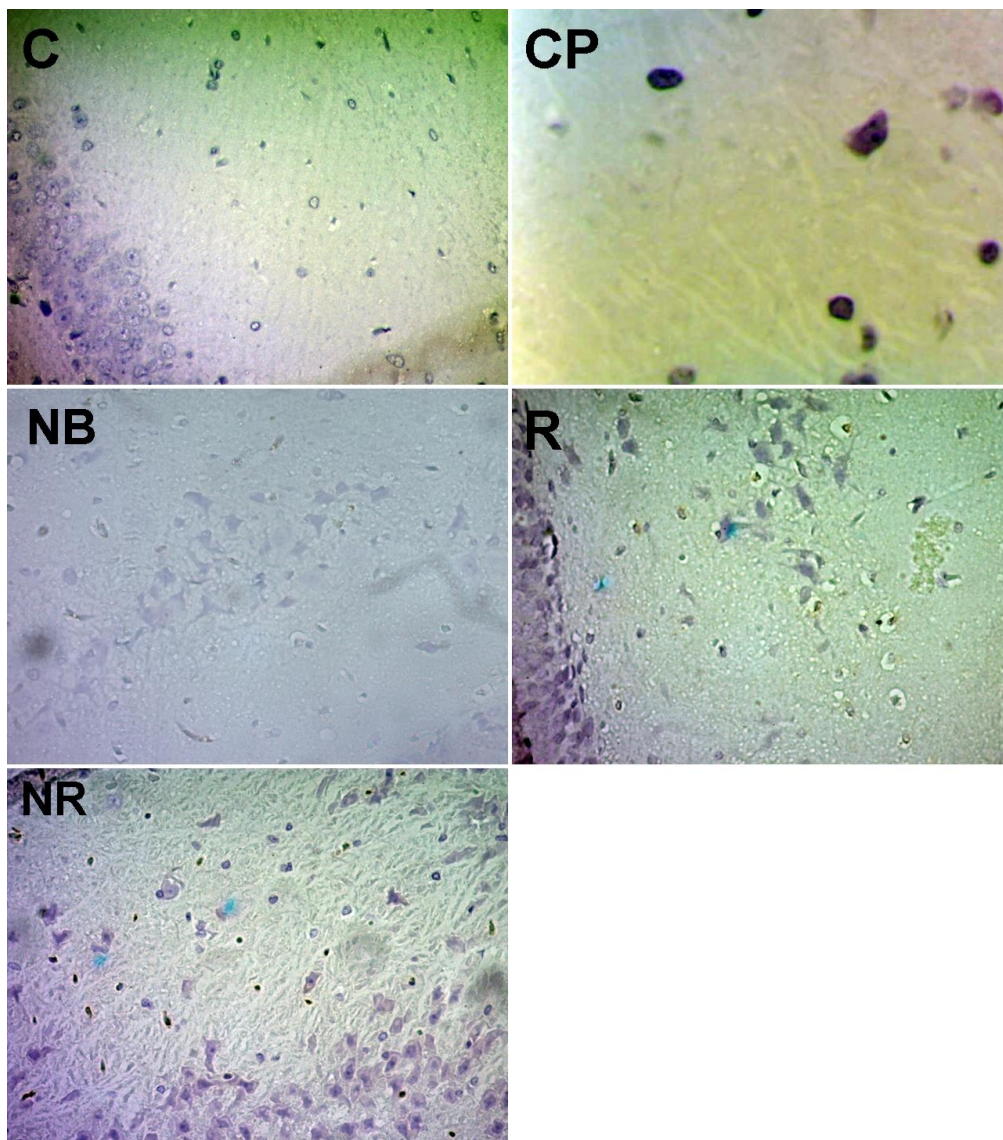


Figura 10. Análise imunohistoquímica de CD68 sendo a coluna à esquerda com 40x, para o grupo NR não observa-se a ativação da micróglia, diferentemente dos grupos NB, CP e R, que conforme as imagens no aumento de 40x demarcadas apontam a um aumento ativação da micróglia levando a ponderar um processo inflamatório.

Conforme mostra no gráfico 3, a avaliação de ativação da micróglia pode ser observada nos grupos CN, NB e R, com valores médios de 1.4 ± 0.51 , 1.4 ± 0.51 e 1 ± 0.66 , não havendo diferença estatística entre estes grupos. Notou-se significância estatística entre os grupos C/NR ($p=0.0014$) e C/R ($p=0.0317$).

Anti CD68

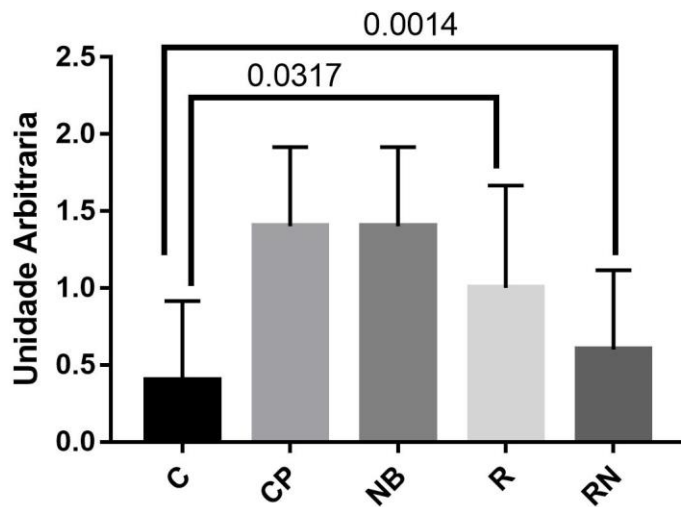


Gráfico 3. Análise quantitativa para CD68, a diferença significativa entre o grupo C e NR apresentou $p=0.0014$, no qual o grupo C e R o também apresentaram significância estatística $p=0.0317$.

Foram avaliados as concentrações de TNF-Alfa, INF-Gama, IL-10 e IL-6 nos grupos C, CP, NB, R, NR. No Gráfico 4, mostra a concentração de TNF-Alfa com média e desvio padrão de 9.06 ± 2.48 no CP, o R obteve os valores de 8.72 ± 1.97 , no NR estes valores foram de 5.15 ± 0.27 e no C de 4.76 ± 1.08 . Notou-se diferença estatística entre os grupos C e CP, C e NB, CP e NR e NB e NR como demonstrado no gráfico abaixo.

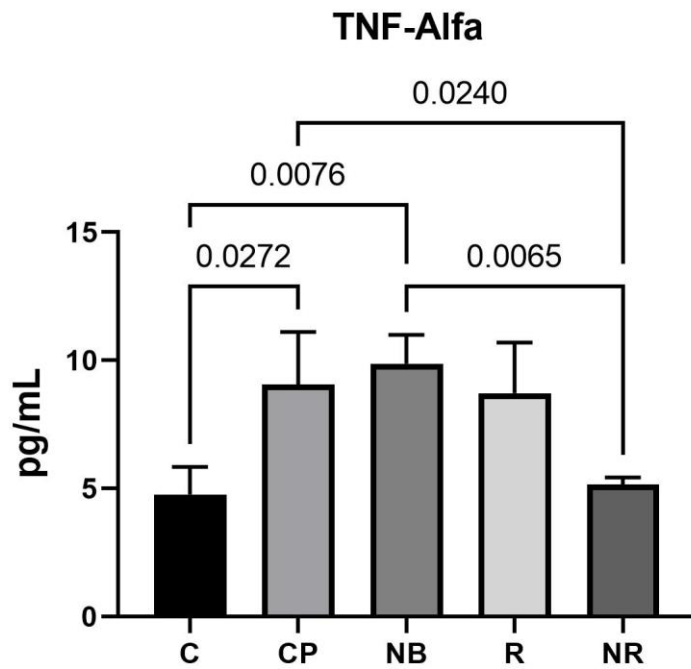


Gráfico 4. Representação da média entre os grupos, apresentando significância entre si em todos os grupos.

No gráfico 5, apresenta os valores de concentração de INF- δ , onde observou-se as médias e desvio padrão CP de 3.25 ± 1.54 , NB 5.31 ± 1.35 em, no grupo R de 6.05 ± 1.79 e grupo NR de 7.50 ± 1.53 . Na análise estatística não foram encontrados significância entre os grupos. Mas notou-se uma 27% em relação R e C, de 15% entre NR e C e de 10% entre R e NR.

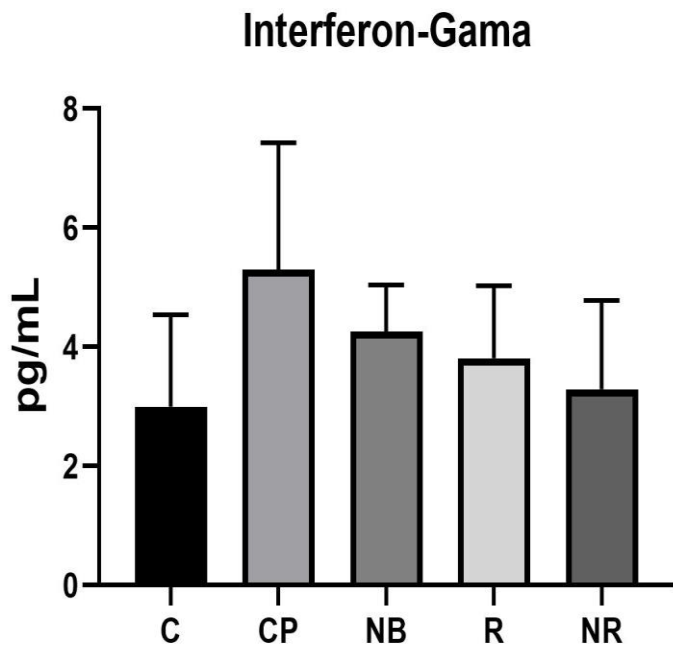


Gráfico 5. Não houve diferença estatística entre os grupos C, CN, NB, R e NR.

Gráfico 6, quando avaliado os níveis de concentração de IL-10, apresentou resultado significativo entre os grupos CP e NR com valor de $p=0.0169$. Os valores médios para a IL-10 no NB foram de 7.50 pg/ml.

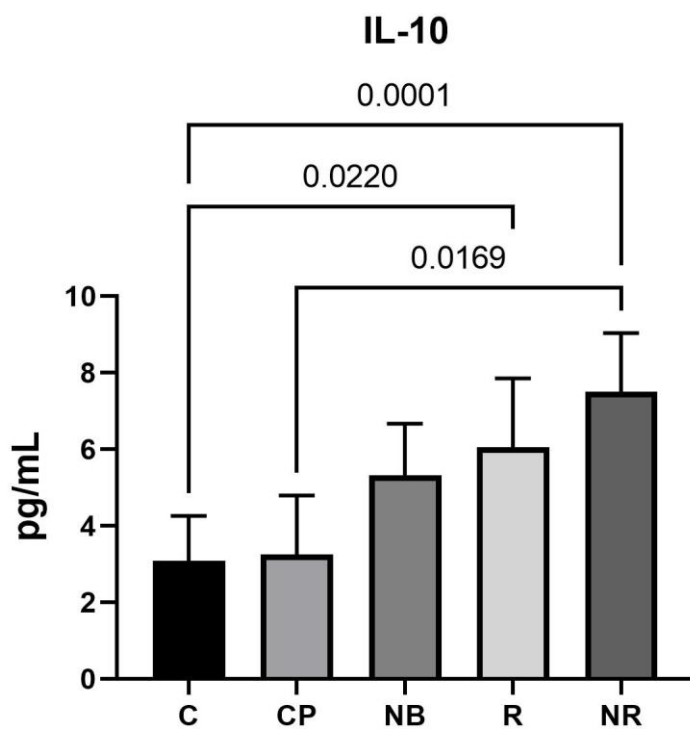


Gráfico 6. Representação das médias de comparação entre os grupo NR e o R com o $p < 0.005$.

Gráfico 7, avaliou os níveis de concentração da IL-6, havendo diferença significativa entre o grupo NR e R, apresentando o $p = 0.0234$. O valor médio da IL-6 foi de 5,27 pg/ml, 4,71 pg/ml, 5,09 pg/ml e 3,23 pg/ml respectivamente CP, NB, R e NR.

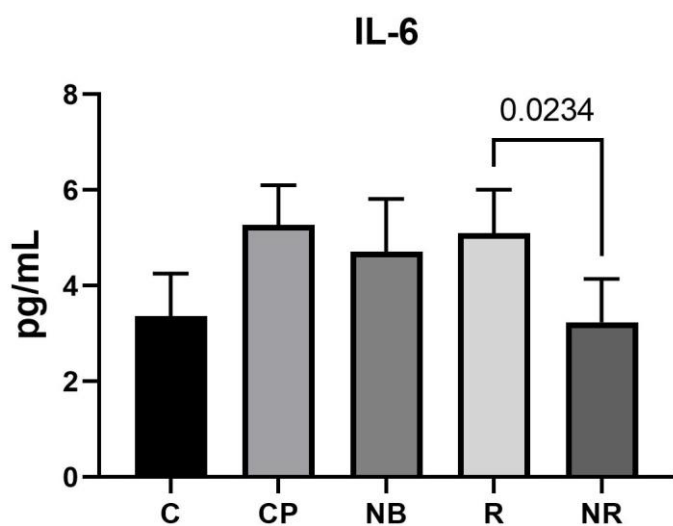


Gráfico 7. Representação da média entre o grupo R e NR com o $p > 0.005$, apresentando diferença estatística.

7. DISCUSSÃO

A DA implica várias complicações, alterações que podem ser irreversíveis, desta forma como relatam no estudo de Beckes *et al.*, (2016) é necessário haver uma interação e interrelações que possam promover e recuperar a saúde do indivíduo que encontra-se nesta situação. Neste sentido, (ILHA *et al.*, 2018) evidenciou a importância de usar artefatos para promover ao paciente com DA melhora na qualidade de vida, socialização, aceitação e suas atividades de vida diária, afirmando que este método pode ser utilizado às pessoas idosas que não apresentam a patologia.

Sabendo que a DA é uma doença degenerativa que provoca danos progressivos no tecido cerebral, os quais ocasionam a perda das sinapses, lesões e mortes neuronais. Na pesquisa de Silva *et al.*, (2016), acreditam que há um denominador comum de que existe uma acumulação de placas amilóides no cérebro dos doentes, o que vem de encontro com o presente estudo que resultou ao acúmulo de placas amilóides nos grupos não tratados resultando em ação significativa sobre o grupo tratado com nanopartículas de resveratrol.

A PPA que é uma proteína membranar possui a principal função de permitir a plasticidade das sinapses, no qual atua com o processo de construção da memória, raciocínio e pensamento. No entanto, a PPA pode sofrer o processo de clivagem pela enzima β -secretase, o mesmo sofre a clivagem pela enzima γ -secretase (SILVA *et al.*, 2019).

Neste estudo foram infundidos os fragmentos $A\beta_{1-42}$ na região hipocampal de CA1, sendo que nos grupos NB e CP foram observados que houve uma maior formação de $A\beta$, juntamente com a morte neuronal e se o peptídeo se acumula na região extracelular do cérebro doente, acaba se formando placas senis, levando a perda neuronal e atrofia cerebral o que pode ser encontrado nestes grupos.

Estudos realizados por Capirala *et al.*, (2012) e Zhong, (2009), relataram que o resveratrol atenua significativamente na produção de citocinas inflamatórias induzida por lipopolissacarídeo (LPS), como IL-1 e TNF induzida por LPS ou $A\beta$ na micróglia.

Neste estudo realizado foi possível observar a deposição de $A\beta$ no grupo R que ocorreu de forma leve e enquanto no grupo NR não foram observadas deposições e nem a ativação da micróglia sendo estes achados que se assemelham aos descritos pelos autores Capirala *et al.*, (2012) e Zhong (2009).

Através de sua pesquisa Hambarzumyan *et al.*, (2015) relatou-se que além de seus grandes papéis como antioxidantes, antiinflamatórios, há evidências que sugerem que o resveratrol também facilita a quebra não amiloidogênica da proteína precursora amilóide (PPA), o que pode ter resultado na não deposição de A β .

Segundo Mehrabadi e Sadr (2020) a ativação da micróglia realiza a liberação de citocinas pró inflamatórias como IL1 β , IFN- δ e TNF- α . Desta forma, no presente estudo no grupo NR a produção de TNF- α demonstrou-se com valores inferiores ao grupo CP.

No estudo de Dong *et al.*, (2019), o resveratrol se manifestou como grande antioxidante com um resultado considerado segura e bem tolerado com a capacidade de cruzar a barreira hematoencefálica, com isso percebeu-se a inibição do TNF- α , também na atual pesquisa verificamos que não houve aumento na produção do TNF- α .

Na DA muitos estudos relatam a ativação da micróglia e também as citocinas pró-inflamatórias são importantes na neuroinflamação e neurodegeneração com isso, na análise de IL10 observou-se que houve diferença estatística entre os grupos CP e o NR o que nos mostra que as nanopartículas contendo resveratrol foram eficientes no combate a neuroinflamação e neurodegeneração.

Na pesquisa de Salem *et al.*,(2019), utilizaram nanoemulsões transferossomas com resveratrol para avaliar como um sistema de direcionamento cerebral sobre a memória, desta forma obtiveram resultados de permeação de até 81,29% \pm 2,64% o que afirmam que pode ser uma ótima opção, porém, neste estudo não foi realizado a quantificação de nanopartículas contendo resveratrol no encéfalo dos animais, contudo pode observar nas análises realizadas que as nanopartículas contendo Resveratrol obtiveram alcance encefálico, evitando a aparecimento de placa senis e bem como a ativação da micróglia.

Vários mecanismos já foram descritos como envolvidos na causa da DA, como fatores genéticos, epigenéticos, metabólicos, reações inflamatórias, cascata patogênica mitocondrial, estresse oxidativo, proteínas plasmáticas e cerebrais, fator neurotrófico derivado do cérebro (brainderivedneurotrophic factor-BDNF), deficiências de estrogênio, além de fatores ambientais.

8.CONCLUSÃO

Dessa forma, conclui-se, que o estudo apresentado revela benefícios das nanopartículas de resveratrol na inibição de deposição de Beta Amilóide, na neuroinflamação no modelo experimentais induzidos por beta amilóide¹⁻⁴².

9. REFERÊNCIAS

ADRIAN, M; JEANDET, P. Effects of resveratrol on the ultrastructure of *Botrytis cinerea* conidia and biological significance in plant/pathogen interaction. 2012; **Fitoterapia**, 83, (8),1345-50.

Associação Brasileira de Alzheimer. Relatório Mundial de Alzheimer 2019: **Atitudes em Demência**. Londres, 2019.

AREZA-FEGYVERES, R, *et al.* Dementia pugilistica with clinical features of Alzheimer's disease. **Arquivos de Neuro-psiquiatria**, v.65, n.3, p. 830-3, 2007.

BARROS *et al.* Lycopene and resveratrol pretreatment did not interfere with the liver of hepatectomized rats. **Acta Cirurgia Brasileira**. 2017; 32, (3), 194-202.

BAUGART, M, *et al.* Summary of the evidence on modifiable risk factors for cognitive decline and dementia: a population-based perspective. **Alzheimers Dement**. 2015; 11, 718–726.

BECKES, D S, *et al.* Interatividade sistêmica entre os conceitos interdependentes de cuidado de enfermagem. **Aquichan**. 2016; 16, (1), 23-31.

BEEG, M, *et al.* Clusterin binds to abeta1-42 oligomers with high affinity and interferes with peptide aggregation by inhibiting primary and secondary nucleation. **J. Biol. Chem**. 2016; 291,(13), 6958-6966.

BLANCO, T. *et al.* Mortality from Alzheimer's disease in Brazil, 2000-2009. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, 31(4):850-860, abr, 2015.

BRANDY, N, *et al.* Neuroprotective Effects of Citrus Fruit-Derived Flavonoids, Nobiletin and Tangeretin in Alzheimer's and Parkinson's Disease. **CNS & Neurological Disorders - Drug Targets**. 2018; 16 , 387-397.

CAVALCANTI, JLS; ENGELHARDT, E. Aspectos da fisiopatologia da doença de Alzheimer esporádica. **Revista Brasileira de Neurologia**. 2012;48, (4).

CAPIRALLA H, *et al.* Resveratrol mitigates lipopolysaccharide- and A_β-mediated microglial inflammation by inhibiting the TLR4/NF-kappaB/STAT signaling cascade. **J. Neurochem**. 2012; 120, 461–472.

CAO J.; HOU J.; PING J.; CAI. D. Advances in developing novel therapeutic strategies for Alzheimer's disease. **Molecular Neurodegeneration**. 2018; 13, (1), 64.

CAIXETA, L. **Doenças de Alzheimer**.1 ed. VitalSource Bookshelf. ArtMed, 2012.

CHATTERJEE A.; ZAKIAN S.; HU X. Singleton MR. Structural insights into the regulation of cohesion establishment by Wp11. **The EMBO Journal**. 2013; 32(5), 677-687.

CHAO, L.L. Effects of home photobiomodulation treatments on cognitive and behavioral function, cerebral perfusion and resting functional connectivity in patients with dementia: a pilot study. Photobiomodulation, Photomedicine, **Laser Surg**. 2019. 37, 133-141.

CRAFT, S.; WATSON, G.S. Insulin and neurodegenerative disease: shared and specific mechanisms. **Lancet Neurol**. 2004; (3):169-178.

CHENG, N, *et al*. Resveratrol-maltol hybrids as multi-target-directed agents for Alzheimer's disease. Volume 26, edição 22 , 1º de dezembro de 2018, páginas 5759-5765.

CHEN, Y, *et al*. Resveratrol improves cognition and decreases amyloid plaque formation in Tg6799 mice. **Mol Med Rep**. 2019; (5):3783-3790.

COPAS, R, *et al*. Griñán-Ferré C, Rodríguez-Farré E, Pallàs M, Sanfeliu C. Resveratrol Induces Brain Resilience Against Alzheimer Neurodegeneration Through Proteostasis Enhancement. **Mol Neurobiol**. 2019; (2):1502-1516.

DONG,Y, *et al*. Drug development for Alzheimer's Disease: Microglia Induced Neuroinflammation as a Target?. **International journal of molecular sciences**. 2019; 20,558.

FERREIRA, S.T, *et al*. Soluble amyloid-betaoligomers as synaptotoxins leading to cognitive impairment in Alzheimer's disease. **Front. Cell.Neurosci**. 2015; 9, 191.

FORLANZA, O. V. Tratamento farmacológico da doença de Alzheimer. **Rev. psiquiatr. Clin.** São Paulo, v. 32, n. 3, pág. 137-148, junho de

2005. Disponível <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-60832005000300006&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 20 de novembro de 2020.

FALCO A, *et al.* **Rey***Doença De Alzheimer: Hipóteses Etiológicas E Perspectivas De **Tratamento Quim. Nova**, Vol. 39, No. 1, 63-80, 2016

FERRI, C. P, *et al.* Global prevalence of dementia: **a Delphi consensus study**. *Lancet* 2005; 366:2112-7.

FROZZA, R.L, *et al.* Characterization of trans-Resveratrol-Loaded Lipid-Core Nanocapsules and Tissue Distribution Studies in Rats. **Journal of Biomedical Nanotechnology**. 2010; 6 ,(6), 694-703,

HAMBARDZUMYAN, D.; GUTIMANN, D.H; KETTENMAN H. The role of microglia and macrophages in glioma maintenance and progression. **Nat Neuroscien.** 2015; 19, (1), 20.

HIGASHIDA, K., *et al.* Effects of Resveratrol and SIRT1 on PGC-1 α Activity and Mitochondrial Biogenesis: A **Reevaluation**. **PLoS Biology**. 2013; 11.

ILHA, K., *et al.* Gerontotecnologias utilizadas pelos familiares/ cuidadores de idosos com Alzheimer: contribuição ao cuidado complexo. **Texto Contexto Enfermagem**. 2018; 27, (4).

JAWAHAR, N. *et al.* Solid lipid nanoparticles for oral delivery of poorly soluble drugs. **Journal of Pharmaceutical Science & Research**, v. 4, n. 7, p. 1848-1855, 2012.

JERÁBEK, J., *et al.* Tacrine-resveratrol fused hybrids as multi-target-directed ligands against Alzheimer's disease. **European Journal of Medicinal Chemistry** (2017).

KERPPERS, F. K. *et al.* Study of transcranial photobiomodulation at 945-nm wavelength: anxiety and depression. **Lasers Med Sci**. 2020; (9):1945-1954.

KIM, T. I., *et al.* Injectable, Cellular-Scale Optoelectronics with Applications for Wireless Optogenetics. **Science**. 2013; (6129):211-216.

LIMA, I.A.D., *et al.* Mucoadhesive chitosan-coated PLGA nanoparticles for oral

delivery of ferulic acid Artificial Cells, **Nanomedicine and Biotechnology**. 2018; 46, (2), 993-1002.

LUZARDO, A.R., *et al.* Características de idosos com doença de alzheimer e seus Cuidadores: uma série de casos em um serviço de Neurogeriatria. **Texto Contexto Enfermagem**, v.15, n.4, p. 587-594, 2006.

MARCATO, P.D. Preparação, caracterização e aplicações em fármacos e cosméticos de nanopartículas lipídicas sólidas. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 6, n. 2, p. 1-37, 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas- Doença de Alzheimer. PORTARIA CONJUNTA Nº 13, 2017.

MUSIEK, E.S.; HOLTZMAN, D.M. Three dimensions of the amyloid hypothesis: time, space and ‘wingmen’. **Nat Neurosci**. 2015; 18 (6):800-806.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Demência. Ministério da Saúde, Brasil, 2017.

PASINETTI, G.M. *et al.* Roles of resveratrol and other grape-derived polyphenols in Alzheimer's disease prevention and treatment. **BiochimBiophysActa**. 2015; 1852, (6),1202-1208.

PAULUK, D. P. A. K. , *et al.* Chitosan-coated zein nanoparticles for oral delivery of resveratrol: Formation, characterization, stability, mucoadhesive properties and antioxidant activity. **Food Hydrocolloids**. 2019; 94, 411-417.

PANIS, L.I. *et al.* Exposure to particulate matter in traffic: A comparison of cyclists and car passengers. **Atmospheric Environment**. 2010; 44, (10), 2263-2270.

PIOVESANA, M. C. F. S. *et al.* Reassessment of the dementia diagnosis of Alzheimer's disease in patients enrolled on the cholinesterase inhibitors dispensation program. **Dement Neuropsychol** . 2012 Out-Dez; 6 (4): 270–275.

PURUSHOTHUMAN, S., *et al.* Photobiomodulation with near infrared light mitigates Alzheimer's diseaserelated pathology in cerebral cortex – evidence from two transgenic mouse models. **Alzheimers. Res**. 2014; (6): 1-13.

REGE, S.D. *et al.* Resveratrol protects oxidative damage induced by amyloid and memory-associated proteins in neuronal cells of the H19-7 hippocampus. **Curr Alzheimer Res.** 2015; 12, (2), 147-56.

SALEM, H.F.; KHAERSHOUM, M. R.; ABOUD-TALEB H.A.; NAGUIG, D. M. Brain targeting of resveratrol through intranasal lipid vesicles labelled with gold nanoparticles: *in vivo* evaluation and bioaccumulation investigation using computed tomography and histopathological examination. **Journal of Drug Targeting.** 2019; 27, (10), 1127-1134.

SAAD, P.M. Demographic trends in Latin America and the Caribbean. In: Coltear D, editor. Population aging: is Latin America ready? Washington DC: **World Bank Publications**; 2010. p. 43-75.

SALTMARCHE, A. E.; NAESER, M.A.; HO, K.F.; HAMBLIN, M.R.; LIM, L. Significant Improvement in Cognition in Mild to Moderately Severe Dementia Cases Treated with Transcranial Plus Intranasal Photobiomodulation: Case Series Report. **Photomedicine and Laser Surgery.** 2017, 35(8):432-441.

SAWDA, C.; MOUSSA, C.; TURNER, R.S. Resveratrol for Alzheimer's disease. **Anais da Academia de Ciências de Nova York.** 2017; 1403,(1), 142-149.

SEVIGNY, J., *et al.* The antibody aducanumab reduces Aβ plaques in Alzheimer's disease. **Nature.** 2016; 537 (7618), 50-56.

SELKOE, D. J.; HARDY J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. **Embo Mol Med.** 2016; 8, (6), 595-608.

SILVA, L. R., *et al.* Cost-effectiveness analysis of the treatment of mild and moderate Alzheimer's disease in Brazil **Braz J Psychiatry** . 2019; 41 (3): 218–224.

SHENGQUAN, H., *et al.* Significant combination of Aβ aggregation inhibitory and neuroprotective properties *in silico*, *in vitro* and *in vivo* by bis(propyl)-cognitin, a multifunctional anti-Alzheimer's agent. **European Journal of Pharmacology.** 2020; 876, 1-10.

SILVA, T.U.; FREITA, L.V.; REY, N.A.; MACHADO, S.P. Estudo Teórico de

potenciais agentes para o tratamento da doença de Alzheimer derivados da 8-Hidroxiquinolina com substituintes do tipo N-ACIL—hidrazona. **Quim. Nova.**2018;41, (10), 1132-1139.

SHARMA, S.; CHOPRA, K.; KULKAMI, S.K.; AGREWALA, J.N. Resveratrol and curcumin suppress immune response through CD28/CTLA-4 and CD80 co-stimulatory pathway. **Clin. Exp. Immunol.** 2007; 147, 155–163.

SHAUL, H. *et al.* International **Journal of Biopharmaceutics**, v. 5, n. 3, p. 190-196, 2014.

SURENDER, V.; DEEPIKA, M. Solid lipid nanoparticles: a comprehensive review. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 8, n. 8, p. 102-114, 2016.

TALBOT, K. *et al.* Demonstrated brain insulin resistance in Alzheimer's disease patients is associated with IGF-1 resistance, IRS-1 dysregulation, and cognitive decline. **J Clin Invest.** 2012; (4):1316-1338.

TELLONE, E.; GALTIERI, A.; RUSSO, A.; GIARDINA, B.; FICARRA, S. Resveratrol: a focus on several neurodegenerative diseases. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity.** 2015; 2015.

UIDA, N. *et al.* Resveratrol via sirtuin-1 downregulates RE1-silencing transcription factor (REST) expression preventing PCB-95-induced neuronal cell death. **Toxicology and Applied Pharmacology.** 2015; 288, (3), 387–398.

VIEGAS, F.P.D., *et al.* Doença de Alzheimer: Caracterização , evolução e implicações do processo neuroinflamatório. **Ver Virtual Quim.** 2011, 3(4),286-306.

YOO, B. K., *et al.* E22G pathogenic mutation of Betaamyloid(abeta) enhances misfolding of abeta40 by unexpected prion-like cross talk between Abeta42 and Abeta40. **J. Am. Chem. Soc.** 2018; 140, (8), 2781-2784.

ZHONG, Q.; JIM, M. Zein nanoparticles produced by liquid-liquid dispersion. **Food Hydrocolloids.** 2009; 23, (8), 2380–2387.

ANEXO A

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA/UNICENTRO

Ofício nº 013/2020 – CEUA/UNICENTRO

Guarapuava, 16/06/2020

Senhor Pesquisador,

1. Comunicamos que seu projeto de pesquisa intitulado: "Estudo das Nanopartículas de resveratrol na memória de curto e longo prazo em modelo experimental da doença de Alzheimer." protocolo número 031/2019, com início em 15/06/2020 e término em 30/04/2020, utilizando-se de "30 Ratos Heterogênicos X", foi analisado e considerado **APROVADO**, pela Comissão de Ética no Uso de Animais de nossa Instituição, em Reunião Ordinária do dia 08/05/2020.

2. Deverá ser encaminhado à CEUA o relatório final da pesquisa e a publicação de seus resultados, para acompanhamento do mesmo.

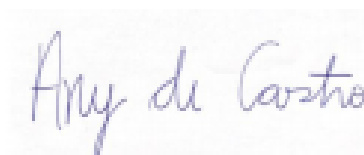
3. Observamos ainda que se mantenha a devida atenção aos Relatórios Parciais e Finais na seguinte ordem:

Os **Relatórios Parciais** deverão ser encaminhados à CEUA assim que tenha transcorrido um ano da pesquisa.

Os **Relatórios Finais** deverão ser encaminhados à CEUA em até **30 dias após a conclusão da pesquisa**.

Qualquer alteração na pesquisa que foi aprovada, como por exemplo, números de sujeitos, local, período, etc. deverá ser necessariamente enviada uma carta justificativa para a análise da CEUA.

Pesquisador: Ivo Ivan Kerppers
Atenciosamente,



Any de Castro Ruiz Marques
Vice-Presidente da Ceua/Unicentro
Port. nº 411- GR/Unicentro-2019

Ao Senhor, Ivo Ivan Kerppers
UNICENTRO-CEDETEG

