

UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

GERMANO DUARTE PORTO

**EFEITOS DA APLICAÇÃO INTRANASAL DE DIFERENTES
DOSES DE NANOPARTÍCULAS DE OURO NO TECIDO
PULMONAR APÓS EXPOSIÇÃO AGUDA À FUMAÇA DE
CIGARRO INDUSTRIAL**

CRICIÚMA, 2020

GERMANO DUARTE PORTO

**EFEITOS DA APLICAÇÃO INTRANASAL DE DIFERENTES
DOSES DE NANOPARTÍCULAS DE OURO NO TECIDO
PULMONAR APÓS EXPOSIÇÃO AGUDA À FUMAÇA DE
CIGARRO INDUSTRIAL**

Dissertação de Mestrado apresentado ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
da Saúde da Universidade do Extremo Sul
Catarinense – UNESC para obtenção do
título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Cesar Lock
Silveira

CRICIÚMA, 2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

P853e Porto, Germano Duarte.

Efeitos da aplicação intranasal de diferentes doses de nanopartículas de ouro no tecido pulmonar após exposição aguda à fumaça de cigarro industrial / Germano Duarte Porto. - 2020.

52 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2020.

Orientação: Paulo Cesar Lock Silveira.

1. Fumaça de cigarro - Efeitos colaterais. 2. Pulmões - Doenças obstrutivas. 3. Pneumopatias obstrutivas. 4. Nanopartículas de ouro. I. Título.

CDD 23. ed. 616.865



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
PRÓ-REITORIA ACADÊMICA - PROACAD
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 609 de 14.03.2019

ATA DE MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – Nº 363

Com início às 14h (quatorze horas) do dia quinze de setembro de 2020 (dois mil e vinte), realizou-se, via ferramenta digital *Google Meet*, o seminário formal de apresentação dos resultados da dissertação de Mestrado de **GERMANO DUARTE PORTO**, sob a orientação do **Prof. Dr. Paulo Cesar Lock Silveira** intitulada **“EFEITOS DA APLICAÇÃO INTRANASAL DE DIFERENTES DOSES DE NANOPARTÍCULAS DE OURO NO TECIDO PULMONAR APÓS EXPOSIÇÃO AGUDA À FUMAÇA DE CIGARRO INDUSTRIAL”**. A dissertação foi examinada por uma banca examinadora constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. Eduardo Pacheco Rico (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovado, Profa. Dra. Alexandra Ioppi Zugno (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovado e Profa. Dra. Deborah de Camargo Hizume Kunzler (UDESC) – Conceito final: Aprovado. Com o resultado final: APROVADO, o aluno finalizou seus estudos em nível de Mestrado, fazendo jus ao grau de MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE. Os trabalhos foram concluídos às 15h (quinze horas), dos quais eu, Fernanda Nunes Peruchi, Assistente Administrativo do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC lavrei a presente ata, que assino juntamente com o Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol, Coordenador do Programa. Criciúma, 11 (onze) de setembro de 2020 (dois mil e vinte).

Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol
Coordenador do PPGCS

Fernanda Nunes Peruchi
Assistente Administrativo

Folha Informativa

A dissertação foi elaborada seguindo a Vancouver e foi apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Fisiopatologia Experimental do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

RESUMO

A inalação de partículas nocivas, como a fumaça de cigarro aparece como fator primordial para o início e estabelecimento da DPOC. A fumaça do tabaco promove, de forma aguda, uma resposta inflamatória exacerbada com indução de estresse oxidativo, contribuindo para o acometimento das vias aéreas e do parênquima pulmonar, além de causar danos ao DNA. Frente a este mecanismo, diversos estudos buscam possíveis terapias para modular estas vias e promover o remodelamento pulmonar. A administração de nanopartícula de ouro (GNP), tem sido demonstrada como proposta anti-inflamatória e antioxidante, em processos de reparo tecidual. Esse estudo teve como objetivo avaliar os efeitos terapêuticos da administração intranasal de diferentes doses de nanopartículas de ouro sobre parâmetros inflamatórios, de estresse oxidativo, histológicos e de genotoxicidade após exposição aguda à fumaça de cigarro industrial no tecido pulmonar. Foram utilizados 30 camundongos Swiss machos pesando entre 25g e 30g, com 2 meses de idade, randomicamente divididos em cinco grupos com seis animais: grupo Sham; grupo fumaça de cigarro (FC); grupo FC + GNP 2,5 mg/L; grupo FC + GNP 7,5 mg/L e grupo FC + GNP 22,5 mg/L. Os animais foram expostos ao cigarro comercial com filtro em uma câmara de inalação de acrílico, durante 5 dias consecutivos. Cada exposição foi composta por 4 cigarros por sessão, sendo 3 sessões/dia, totalizando 12 cigarros/dia. A injeção de solução intranasal de GNP foi realizada ao final de cada dia, logo após a última exposição à FC. Nos resultados observou-se que os níveis de citocina pró-inflamatória TNF- α que receberam diferentes doses de GNP tiveram redução. Os níveis de DCF e Nitrito, os grupos FC + GNP 2,5 mg/L e FC + GNP 7,5 mg/L apresentaram queda significativa. Em relação a genotoxicidade os grupos que receberam GNPs não apresentaram aumento nos danos ao DNA, além daquele causado pela própria exposição a FC. Por fim foi analisado os cortes histológicos, onde os grupos que receberam GNPs reduziram a média de células inflamatórias e o diâmetro alveolar médio. Em conjunto, esses resultados nos permitem observar que a exposição à fumaça de cigarro causa aumento de citocinas inflamatórias, alterações histológicas, danos oxidativos e nitrosivos no pulmão, assim como aumento dos danos ao DNA de células do fígado, plasma sanguíneo e pulmão. A terapia com GNPs reduzidas com citrato e de tamanho médio de 20 nm pode ser promissora no tratamento dessas injúrias pulmonares causadas pela fumaça do cigarro, sem causar maiores efeitos genotóxicos do que aqueles causados pela própria fumaça de cigarro.

Palavras-chave: Fumaça de cigarro; DPOC; Inflamação Pulmonar Aguda; Nanopartículas de ouro

ABSTRACT

Inhalation of harmful particles, such as cigarette smoke, appears as a primary factor for the onset and establishment of COPD. Tobacco smoke acutely promotes an exacerbated inflammatory response with oxidative stress induction, contributing to the involvement of the airways and lung parenchyma, in addition to causing DNA damage. Faced with this mechanism, several studies seek possible therapies to modulate these pathways and promote pulmonary remodeling. The administration of gold nanoparticles (GNP), has been demonstrated as an anti-inflammatory and antioxidant proposal, in tissue repair processes. This study aimed to evaluate the therapeutic effects of intranasal administration of different doses of gold nanoparticles on inflammatory, oxidative stress, histological and genotoxicity parameters after acute exposure to industrial cigarette smoke in lung tissue. Thirty male Swiss mice weighing between 25g and 30g, 2 months old, were randomly divided into five groups with six animals: Sham group; cigarette smoke group (FC); FC + GNP 2.5 mg/L group; FC + GNP group 7.5 mg/L and FC + GNP group 22.5 mg/L. The animals were exposed to the commercial cigarette with filter in an acrylic inhalation chamber, for five consecutive days. Each exhibition consisted of four cigarettes per session, 3 sessions/day, totaling 12 cigarettes/day. The intranasal injection of GNP solution was performed at the end of each day, just after the last daily exposure to CF. The results showed it observed that the levels of pro-inflammatory cytokine TNF- α that received different doses of GNP had a reduction. The levels of DCF and Nitrite, the groups FC + GNP 2.5 mg/L and FC + GNP 7.5 mg/L showed a significant decrease. In relation to genotoxicity, the groups that received GNPs did not show an increase in DNA damage, beyond that caused by their own exposure to CF. Finally, the histological sections were analyzed, where the groups that received GNPs reduced the average of inflammatory cells and the average alveolar diameter. Together, these results allow us to observe the results demonstrate that exposure to cigarette smoke causes an increase in inflammatory cytokines, histological changes, oxidative and nitrosive damage in the lung, as well as increased damage to the DNA of liver cells, blood plasma and lung. Therapy with reduced GNPs with citrate and an average size of 20 nm can be promising in the treatment of these lung injuries caused by cigarette smoke, without causing greater genotoxic effects than those caused by cigarette smoke itself.

Keywords: Cigarette smoke; COPD; Acute Lung Inflammation; Gold nanoparticles

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estreitamento das pequenas vias aéreas na DPOC	11
Figura 2 – Células inflamatórias e imunes envolvidas na DPOC	13
Figura 3 – Análise histológica	30
Figura 4 – Análise de Genotoxicidade Sanguínea e Hepática	31
Figura 5 – Avaliação de citocina inflamatória TNF- α	33
Figura 6 – Determinação intracelular de ERO e NO	34
Figura 7 – Análise de genotoxicidade pulmonar	35

LISTA DE ABREVIATURAS

- AKT – Proteína Quinase B
- ANOVA – Teste de Análise de Variância
- CAT – Catalase
- CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais
- CVF – Capacidade Vital Forçada
- DAMP – Padrão Molecular Associado a Dano
- DCF – 2',7'-Diclorofluoresceína
- DCFH-DA – Diacetato de 2',7'- Diclorodihidrofluoresceína
- DCFH – 2',7' Diclorohidrofluoresceína
- DMSO – Dimetilsulfóxido
- DNA – Ácido Desoxirribonucleico, do inglês *Deoxyribonucleic Acid*
- DPOC – Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
- DRX – Difractometria de Raios-X
- EAA – Espectrometria de Absorção Atômica
- EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-acético, do inglês *Ethylenediamine Tetraacetic Acid*
- ELISA – Ensaio de imunoabsorção enzimática, do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
- ERN – Espécies Reativas de Nitrogênio
- ERO – Espécies Reativas de Oxigênio
- FC – Fumaça de Cigarro
- FD – Frequência de Danos
- FGF – Fator de Crescimento Fibroblástico, do inglês *Fibroblaste Growth Factor*
- GM-CSF - Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos, do inglês *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*
- GSH – Glutathiona Reduzida
- GNP – Nanopartícula de Ouro, do inglês *Gold Nanoparticles*
- GOLD – Iniciativa Global para a Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica, do inglês *Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease*
- GPx – Glutathiona Peroxidase

H₂O₂ – Peróxido de Hidrogénio

HAuCl₄ – Ácido Tetracloroáurico

H/E – Hematoxilina/Eosina

HRP – Peroxidase do Rabano Silvestre

ID – Índice de Danos

IKB- α – Proteína Inibitória Kappa b alfa

IKK- β – Proteína Quinase Beta de IKB

IL1 β – Interleucina 1 β

IL4 – Interleucina 4

IL6 – Interleucina 6

IL10 – Interleucina 10

IL18 – Interleucina 18

INF- γ – Interferon Gamma

LPS – Lipopolissacarídeo

MA – Macrófagos Alveoláres

MAPK – Proteína Quinase Ativada por Mitogénio, do inglês *Mitogen-activated Protein Kinase*

MMP's – Metaloproteases

MMP-9 – Matriz Metalopeptidase 9, do inglês *Matrix Metalloproteinase 9*

NAC – N-acetilcisteína

NaCl – Cloreto de Sódio

NaNO₂ – Nitrito de Sódio

Na₃C₆H₅O₇·2H₂O – Citrato de Sódio Di-hidratado

NaOH – Hidróxido de Sódio

NF κ B – Fator Nuclear Kappa B

NO – Óxido Nítrico

O₂⁻ – Radical Superóxido

[•]OH – Radical Hidroxila

ONOO – Peroxinitrito

PBS – Tampão Fosfato

PFA – Paraformaldeído

SRP – Superfície de Plasmon Ressonante

SOD – Superóxido Desmutase

STAT1 – Transdutor de Sinal e Ativador da Transcrição 1, do inglês *Signal Transducer inglês and Activator of Transcription 1*

TGF – Fator Transformador de Crescimento, do inglês *Transforming Growth Factor*

TGF- β – Fator Transformador de Crescimento β , do inglês *Transforming Growth Factor β*

TMB – Tetrametilbenzidina

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral, do inglês *Tumoral Necrosis Factor*

TNFR1 – Receptor 1 do Fator de Necrose Tumoral 1, do inglês *Tumor Necrosis Factor Receptor 1*

TNFR2 – Receptor 2 do Fator de Necrose Tumoral 2, do inglês *Tumor Necrosis Factor Receptor 2*

TRIS – Tris-(hidroximetil)-aminometano

TRITON-X – T - octilfenoxipolietoxietanol

TWEEN 20 – Monolaurato de Polioxietileno Sorbitano

UNESC – Universidade do Extremo Sul Catarinense

UV-Vis – Ultravioleta-Visível

VEF1 – Volume Forçado no Primeiro Segundo

SUMÁRIO

1.1	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica.....	10
1.2	Inflamação pulmonar	12
1.3	Estresse oxidativo e genotoxicidade após exposição à fumaça de cigarro.....	16
1.4	Nanopartículas de ouro	18
2	OBJETIVOS	21
2.1	Objetivo geral	21
2.2	Objetivos específicos	21
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
3.1	Animais	22
3.2	Desenho experimental.....	22
3.3	Síntese da GNP	24
3.4	Análise Histológica.....	25
3.5	Análises bioquímicas	26
3.5.1	Quantificação por ELISA	26
3.5.2	Espécies reativas.....	27
3.5.3	Dano ao DNA (ensaio cometa).....	27
3.6	Análises estatísticas.....	29
4.	RESULTADOS	30
4.1	Análise histológica.....	30
4.2	Análise de Genotoxicidade Sanguínea e Hepática.....	31
4.3	Avaliação de citocina inflamatória TNF- α	32
4.4	Determinação intracelular de ERO e NO.....	33
4.5	Análise da genotoxicidade pulmonar	34
5	DISCUSSÃO	36
6	CONCLUSÃO	44
	REFERENCIAS	45

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

Segundo a *Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease* (GOLD), a DPOC caracteriza-se por sintomas respiratórios persistentes, que são tosse, dispnéia e expectoração, levando a limitação do fluxo aéreo devido a alterações estruturais das vias aéreas e/ou alveolares, geralmente causada pela exposição significativa a partículas e gases nocivos, como exposição ambiental e ocupacional, fatores genéticos e relacionadas a idade, porém é comumente associada à inalação de fumaça de cigarro. Além desses fatores de risco ambientais, temos o fator genético que apresenta uma deficiência na proteína α -1 antitripsina, desenvolvimento pulmonar prejudicado na infância e até o próprio envelhecimento (Balkissoon 2019; Russo et al. 2019).

Existem três mecanismos patológicos principais nos pulmões com DPOC, existindo uma variabilidade entre os indivíduos. A bronquite crônica envolve hiperplasia de células caliciformes com aumento de secreção de muco, que leva a maior obstrução das vias aéreas pela depuração ciliar reduzida com consequente aumento de secreção nas vias aéreas, que levam a queda da função e homeostase pulmonar. Já o enfisema é devido a destruição das paredes alveolares resultando em menor difusão de gases e parece ser uma característica tardia da patologia, e a doença obstrutiva das pequenas vias aéreas, que é uma característica inicial da patologia e está ligada a progressão da doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) (Zhou-Suckow et al. 2017; Barnes 2019).

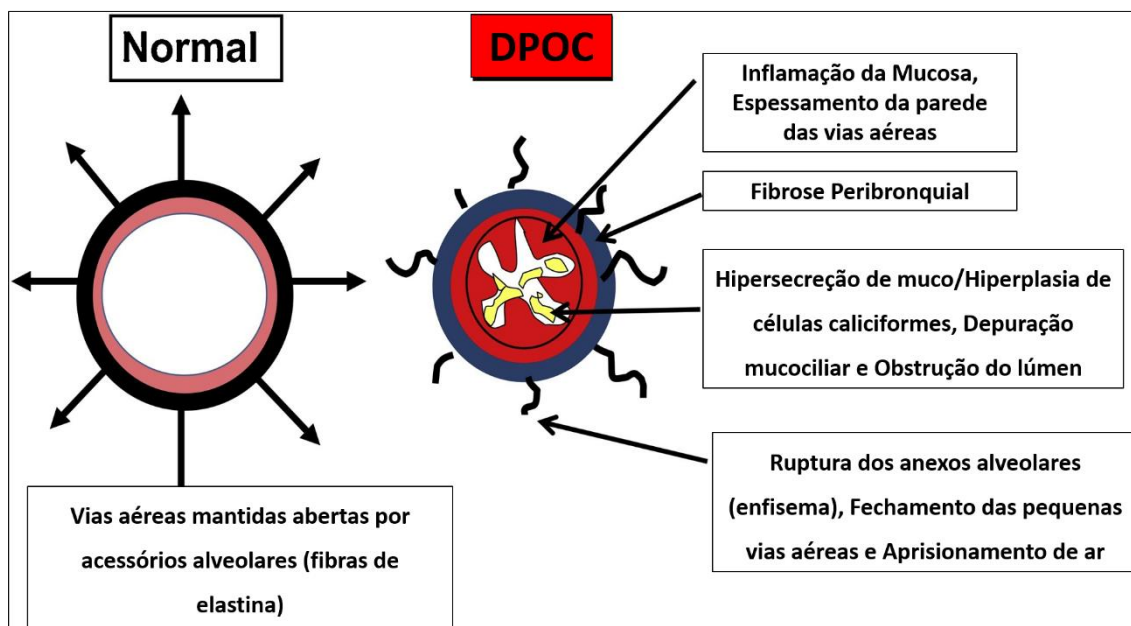


Figura 1: *Mecanismo de estreitamento das pequenas vias aéreas na DPOC*: As vias aéreas normais têm uma parede fina e são mantidas abertas por acessórios alveolares que contêm fibras de elastina. Na DPOC, as pequenas vias aéreas são estreitadas porque as paredes das vias aéreas se tornam espessadas como resultado da inflamação com ocorrência de fibrose peribronquiolar progressiva. Além disso, o lúmen é ocupado por muco tenaz como resultado da hiperplasia das células caliciformes, há comprometimento da depuração ciliar e hipersecreção, além da perda das ligações alveolares devido ao enfisema, resultando em fechamento das vias aéreas na expiração e aprisionamento de ar nos pulmões. Fonte: (Barnes 2019) com adaptações do autor (2020).

A base da mecânica subjacente à DPOC é complexa, e pode envolver inflamação recorrente, estresse oxidativo, desequilíbrio de proteases/antiproteases, insultos ambientais e genética do hospedeiro. O tabagismo serve como a principal fonte de oxidantes e espécies reativas de oxigênio (ERO) para o pulmão e outros órgãos, e juntamente com a inflamação persistente pode levar a extensos danos nos tecidos (Fischer, Voynow, and Ghio 2015).

A inflamação associada à doença vai afetar predominantemente o parênquima pulmonar e as vias aéreas periféricas, resultando na limitação do fluxo aéreo amplamente irreversível e progressivo. Esta inflamação é caracterizada pelo aumento do número de macrófagos alveolares, neutrófilos e linfócitos T, que são recrutados da circulação, mesmo após a cessação do tabagismo, resultando em um aumento continuado de enzimas proteolíticas, gerando desequilíbrio nas proteases e defesa antiproteolítica, gerando

destruição progressiva da matriz pulmonar (Churg et al. 2004; Wright and Churg 2007; Barnes 2014).

Além da destruição alveolar, a fibrose das pequenas vias aéreas parece ser um mecanismo importante para o estreitamento das vias, agora sendo reconhecido como o mecanismo mais importante e antigo da progressão da DPOC. O número de mediadores inflamatórios como TNF- α , IL 1 β , TGF β , CXCL-8 e fatores de estimulação de macrófagos (GM-CSF) liberados por células epiteliais do pulmão são características importantes na patogênese da DPOC, sendo a principal causa de desenvolvimento de fibrose é a remodelação do tecido da vias aéreas induzida pela diferenciação dos miofibroblastos mediados pelo TGF β , sendo a gravidade da obstrução relacionada com o nível de fatores de crescimento no epitélio (Arora et al. 2018; Barnes 2019).

1.2 Inflamação pulmonar

O trato respiratório humano é constantemente confrontado com cerca de 10.000 L/dia de ar, contendo componentes ambientais inofensivos, mas também, componentes ambientais prejudiciais, além de patógenos. Para isso o hospedeiro necessita de um refinado sistema de defesa para detectar antígenos inalados e desencadear respostas imunes pró-inflamatórias e anti-inflamatórias (Hartl et al. 2018).

Irritantes inalados, como a fumaça do cigarro, ativam células epiteliais, dendríticas (vias aéreas inferiores), neutrófilos e macrófagos alveolares para liberar múltiplas citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL1 β e IL6) e várias quimiocinas (CXCL 1, 8, 3 e 12) que atraem as células circulantes para os pulmões, esse aumento de influxo de células nas vias aéreas leva ao agravamento dos processos inflamatórios, liberação de EROs, proteases, quimiocinas e citocinas (Barnes 2008; Strzelak et al. 2018).

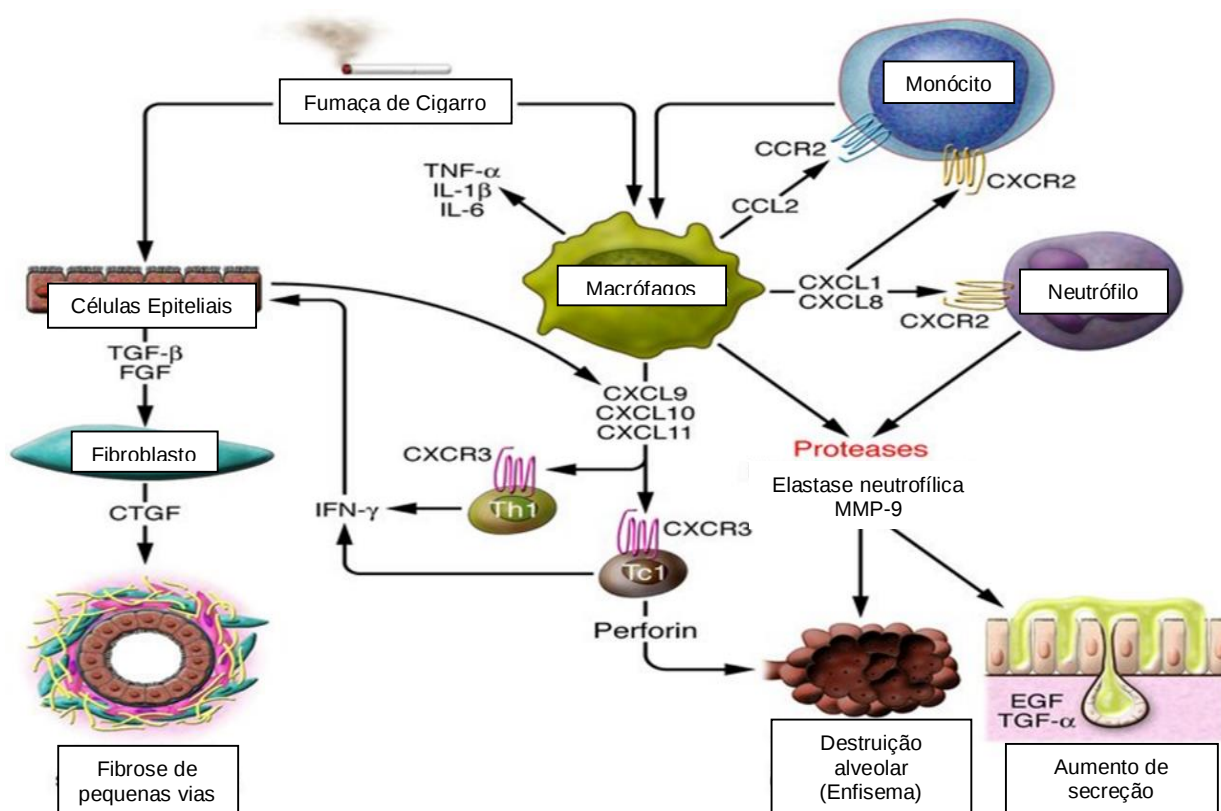


Figura 2: A fumaça do cigarro inalada ativa células epiteliais e macrófagos que liberam fatores quimiotáticos que atraem células inflamatórias para o pulmão, incluindo, CCL2 que atua no receptor CCR2 atraindo monócitos, CXCL1 e CXCL8 que atuam no receptor CXCR2 atraindo neutrófilos e monócitos que se diferenciam em macrófagos no pulmão, CXCL9, CXCL10 e CXCL11 atuam no receptor CXCR3 atraindo células T que juntamente com os macrófagos e células epiteliais liberam metaloproteinasas (MMP-9) que causa degradação da elastina e enfisema, e a elastase neutrofílica causa a hipersecreção de muco. As células epiteliais e macrófagos liberam fatores de crescimento, estimulando a proliferação de fibroblastos, resultando em fibrose das pequenas vias. Fonte: Barnes (2008) com adaptações do autor (2020).

A necroptose epitelial das vias aéreas, uma forma regulada de necrose e a liberação associada de padrões moleculares de receptores de danos (DAMP) estão associados ao desenvolvimento da DPOC. Os DAMPs podem desencadear respostas imunes inatas, deste modo, a necroptose epitelial e a liberação de DAMPs induzidas pela fumaça de cigarro iniciam a inflamação das vias aéreas na DPOC (Pouwels et al. 2016).

As células dendríticas tem um papel central no início da resposta imune, as vias aéreas são ricas dessas células, que ficam localizadas perto da superfície, idealmente para sinalizar a entrada de substâncias estranhas

inaladas e ativar uma variedade de outras células imunológicas e inflamatórias, incluindo macrófagos, neutrófilos, linfócitos T e B. As células epiteliais também são ativadas pela fumaça do cigarro, linfócitos T inatos são abundantes nas mucosas pulmonares e produzem altos níveis de mediadores inflamatórios (TNF- α , INF- γ , IL1 β e IL8), fatores de crescimento TGF- β induzindo fibrose local nas pequenas vias, além de perforinas e granzimas (Hartl et al. 2018; Barnes 2019).

Os macrófagos alveolares (MA) é o tipo celular mais abundante no espaço aéreo saudável, sendo a primeira linha de defesa, juntamente com as células epiteliais, contra agentes nocivos. A fumaça do cigarro ativa os macrófagos alveolares, liberando mediadores inflamatórios (TNF- α , IL8, quimiocinas CXCL, monócitos, EROs, e enzimas elastolíticas) e aumenta em várias vezes o número desse tipo de célula, altera as moléculas de adesão na superfície celular, com maior atividade de lactato desidrogenase e proteases. A plasticidade fenotípica permite que os macrófagos se adaptem ao ambiente ao qual estão expostos, classificando-se como macrófagos M1 ativados classicamente, ou macrófagos M2 ativados alternativamente. Os fenótipos M1 exibem propriedades antimicrobianas aprimoradas, liberam citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL6, enquanto os M2 exibem um perfil anti-inflamatório com liberação de IL10 e fatores de crescimento TGF- β (Barnes 2008; Strzelak et al. 2018).

O efeito biológico das quimiocinas é o recrutamento de leucócitos para o microambiente das vias aéreas. Em uma reação inflamatória aguda os neutrófilos são atraídos primeiro, é o subconjunto mais abundante de leucócitos que busca no sangue possíveis lesões, tendo como principal papel a morte e remoção de patógenos, e são seguidos por monócitos e linfócitos para uma resposta mais sustentada (Paula et al. 2015; Hartl et al. 2018). Se não controlada, a inflamação resulta em sérios problemas pulmonares provocando extravasamento de proteínas para o espaço alveolar, acúmulo de células leucocitárias e edema intersticial com comprometimento da integridade celular epitelial caracterizada por sinais clínicos como hipoxemia grave, edema pulmonar e acúmulo de neutrófilos, estando associada à morbidade e mortalidade em diversas doenças (Rubenfeld 2003; Zhang et al. 2009).

A exposição a curto prazo à fumaça de cigarro não causa DPOC, entretanto, células inflamatórias, citocinas e marcadores redox estão presentes nos pulmões de fumantes e contribuem para o estresse oxidativo e a inflamação. Estudos de Churg e colaboradores (2004) concluíram que a maior parte da degradação da matriz é mediada via TNF- α e neutrófilos, com a elastase neutrofílica como maior efetor; a outra parte tem uma patogênese diferente relacionada a outras proteases ou destruição direta por MMPs, mostrando que o TNF- α é crucial não apenas para a resposta inflamatória a exposição aguda à fumaça de cigarro, mas para o desenvolvimento real do enfisema.

Os neutrófilos liberam extracelularmente proteases e elastases de neutrófilos, além de mieloperoxidases, sendo esse processo bem reconhecido em patologias pulmonares como o DPOC (Wright and Churg 2007; Kennedy-Feitosa et al. 2016).

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória forte, que desempenha um importante papel no sistema imune durante a inflamação, inúmeras células podem produzir essa citocina, por exemplo, macrófagos, células T e B, neutrófilos, células endoteliais, entre outras. Sua produção é estimulada por agressões que gerem infecção e inflamação. Seus efeitos biológicos são mediados via receptores TNFR1 localizados em quase todos os tipos de células e receptores TNFR2 localizado principalmente em células imunes e endoteliais (Zelová and Hošek 2013).

Além disso, nos pulmões, vários estímulos inflamatórios têm mostrado ativar a transcrição do fator nuclear NF- κ B, implicando esta via como um ponto focal para a indução da inflamação pulmonar (Barnes, Shapiro, and Pauwels 2003; Churg et al. 2004). Em condições normais, o NF- κ B, que é composto principalmente pelas subunidades p50 e p65, é encontrado no citoplasma das células em sua forma inativa ligada ao seu inibidor I κ B. Após um estímulo inflamatório, as I κ B quinases fosforilam I κ B, que é degradado, e liberam NF- κ B, que se transloca para o núcleo para induzir a transcrição de genes envolvidos no início precoce da resposta inflamatória, como as citocinas pró-inflamatórias (Victor et al. 2012; Silveira, Venâncio, et al. 2014; Paula et al. 2015; Dos Santos Haupenthal et al. 2020).

Células inflamatórias podem danificar o pulmão através da liberação de ERO's, proteases (MMP e elastase), peroxidases (mieloperoxidase), citocinas e

fatores de crescimento, embora não seja o mecanismo primário da patogênese pulmonar, pode contribuir para um ambiente profibrótico, afetando o processo de reparo da ferida e o nível de estresse oxidativo (Kliment and Oury 2010).

1.3 Estresse oxidativo e genotoxicidade após exposição à fumaça de cigarro

A fumaça do tabaco é uma mistura de gases e partículas, com uma composição química complexa de mais de 8.700 constituintes químicos identificados e com propriedades físicas específicas, que interagem com células, tecidos e órgãos do corpo humano após inalação. Influenciando diretamente o funcionamento das células pulmonares, com propriedades pró-inflamatórias, citotóxicas, mutagênicas e carcinogênicas (Strzelak et al. 2018).

Essa fumaça contém grandes quantidades de radicais livres e oxidantes, mais de 10^{15-17} moléculas de oxidantes e radicais livres por baforada, a inalação de agentes oxidantes resulta em dano pulmonar direto e ativação da resposta inflamatória levando a lesões adicionais nos tecidos, sendo os compostos reativos mais importantes o radical superóxido (O_2^-), óxido nítrico (NO), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($^{\bullet}OH$). A produção dessas EROs induzem a carga oxidativa em fumantes, afetando a biogênese mitocondrial e o controle de qualidade mitocondrial na patogênese das doenças pulmonares, pois o DNA mitocondrial tem susceptibilidade ao dano oxidativo (Rahman and Kinnula 2012; Jiang, Wang, and Hu 2017; Strzelak et al. 2018; Pedroso-Fidelis et al. 2020).

O estresse oxidativo tem papel central na patogênese de distúrbios inflamatórios nos pulmões, é definido como o desequilíbrio entre a produção de oxidantes e as defesas antioxidantes, o aumento da carga oxidativa nos fumantes resulta das EROs e Espécies reativas de nitrogênio (ERNs) liberadas por células ativadas (macrófagos, células epiteliais, neutrófilos e linfócitos T) levando à disfunção celular e ao dano tecidual, podendo induzir apoptose nas células endoteliais e epiteliais, principalmente nos pneumócitos tipo 1, contribuindo para o desenvolvimento de enfisema, pode induzir apoptose ativando a via do NF- κ B por dano direto ao DNA, resultando na amplificação da inflamação. No pulmão, o estresse oxidativo é algo único devido à alta exposição

ao oxigênio quando comparado a outros tecidos. A interação entre a fumaça e o líquido epitelial de revestimento pulmonar permite uma maior produção de ERO's nas vias aéreas por conter muitos íons metálicos, como os de ferro, que catalisam a produção de radicais livres. (Barnes, Shapiro, and Pauwels 2003; Kliment and Oury 2010; Strzelak et al. 2018).

Fisiologicamente a maioria das ERO's são produzidas na cadeia respiratória mitocondrial, sendo que 2-5% do oxigênio (O_2) é desviado para a formação de radicais livres. Outros eventos bioquímicos celulares como processos inflamatórios, isquemia/reperfusão, oxidação de catecolaminas, entre outros, podem gerar ERO's (Halliwell 2006).

As defesas antioxidantes atuam de forma associada ou independente por duas vias: enzimáticas e não enzimáticas. O sistema enzimático constituído por enzimas SOD (superóxido dismutase), CAT (catalase) e GPx (glutathione peroxidase) são ativadas normalmente durante o metabolismo celular, porém suas atividades podem aumentar em função da presença aumentada de ERO. As vias não enzimáticas incluem as vitaminas E, C e betacaroteno, glutathione (GSH), N-acetilcisteína (NAC) (Urso and Clarkson 2003; Halliwell 2006).

Estudos mostram aumento da produção de EROs em leucócitos e aumento do estresse oxidativo no plasma e no lavado broncoalveolar de cobaias expostas a fumaça de cigarro. Os níveis de estresse oxidativo têm se mostrado negativamente correlacionados com aspectos da função pulmonar e podem fornecer informações sobre a gravidade da doença. Dadas estas evidências, é sugerido que os radicais livres desempenham um papel importante na fibrose pulmonar. Níveis aumentados de ERO's contribuem para a inativação de antiproteases (α_1 -antitripsina) e ativação de metaloproteases (MMPs), resultando em desequilíbrio, contribuindo diretamente para a degradação da matriz pulmonar (Kliment and Oury 2010; Strzelak et al. 2018).

Outros mecanismos fisiopatológicos pelos quais a fumaça do cigarro pode alterar a transcrição do gene de citocinas pró-inflamatórias são alterações induzidas no epigenoma, como metilação do DNA, expressão do microRNA e modificações das histonas (Barnes, Shapiro, and Pauwels 2003). O dano oxidativo ao DNA é decorrente da exposição a EROs, quando persistente acarreta risco de interromper a função celular e mutações, para lidar com esse quadro, os organismos vivos desenvolveram mecanismos de reparo muito

eficientes, porém com riscos de a célula deixar o DNA sem reparo contribuindo para o processo de envelhecimento e desenvolvimento de doenças (Poetsch 2020).

Muitos estudos demonstram que a exposição a fumaça de cigarro pode induzir quebra de fitas de DNA em roedores, células de mamíferos em cultura *in vitro*, sendo consistentes as indicações que as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio são as principais causas de quebra de fitas de DNA, e também responsável pela indução de apoptose de fibroblastos pulmonares, sugerindo que há um desequilíbrio entre defesa antioxidante primária ou sistema complementar de reparo de DNA pelo aumento de danos oxidativos ao DNA induzidos pelo tabagismo (Carnevali et al. 2003; DeMarini 2004; Pan et al. 2009).

1.4 Nanopartículas de ouro

A nanotecnologia é um campo promissor para o diagnóstico e tratamento de uma variedade de doenças, exibem funcionalidades e propriedades biológicas devido ao seu tamanho, onde controla-se a estrutura da matéria a níveis moleculares, despertando muito interesse de diferentes grupos e áreas de pesquisa, representando o início de uma nova e revolucionária era, com novas propriedades e comportamento de matérias (Bhattacharya and Mukherjee 2008; Elbakary et al. 2018; Ortiz-Benitez et al. 2019).

A entrada das GNPs no corpo ocorre de diferentes maneiras, como ingestão, inalação e contato com as superfícies do corpo. A utilização das nanopartículas no campo biomédico tem demonstrado interesse devido à sua estabilidade química; facilidade de síntese e processo de fabricação; biocompatibilidade genuína e não interferência com outros biomateriais; bioconjugação de superfície com sondas moleculares; propriedades ópticas marcantes e baixa citotoxicidade (Shukla et al. 2005; Kim, Park, and Lim 2015). Além disso, a capacidade de conjugação com peptídeos e proteínas pode direcionar as GNPs para parceiros de interação específicos, sendo que quanto mais distribuída, melhor a sua ação terapêutica (Ghosh et al. 2008; Elbakary et al. 2018).

O tamanho das GNPs determina diferenças na biodistribuição e excreção, as GNPs de maior tamanho, tem um ponto de corte maior que o da

filtração renal, não sendo excretadas pela urina, em vez disso, são eliminadas do sangue via sistema retículo-endotelial, se acumulando no baço e fígado, sendo que quanto maior a GNP, maior sua concentração no baço. Tendo efeito oposto no intestino, onde o maior acúmulo foi à medida que as GNPs diminuíram (Lopez-Chaves et al. 2018).

Em estudos de De Jong et al. (2008) foi observado que após administração intravenosa de GNPs, foi demonstrado que a menor partícula estudada, 10 nm, revelou distribuição tecidual mais difundida nas primeiras 24 horas após a administração, sendo encontradas em fígado, baço, rim, pulmão, cérebro e órgãos reprodutivos, enquanto que as partículas maiores de 50, 100 e 250 nm revelaram quase exclusivamente distribuição no fígado, baço e sangue.

Os altos valores de GNPs encontrados no intestino e nas fezes, e a administração não enteral das GNPs mostra que as fezes é a principal via endógena de eliminação das nanopartículas, além disso, resultados obtidos na urina mostram níveis muito baixos GNPs, excluindo a urina como principal via de excreção (Lopez-Chaves et al. 2018; Xiong et al. 2018).

A utilização de nanopartículas no tratamento de diversas doenças surge devido evidências como um promissor antioxidante e anti-inflamatório, sendo testadas no tratamento de diferentes doenças em modelos de lesão tecidual. Esse efeito anti-inflamatório age principalmente sobre as citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL1 β reduzindo seus níveis (Tsai et al. 2007; Bhattacharya and Mukherjee 2008; Victor et al. 2012; Karthick et al. 2014; Silveira, Venancio, et al. 2014; Chen et al. 2015).

Conforme o mecanismo de ação proposto por Lai e colaboradores (2016), as GNP's impedem a formação de estresse oxidativo intracelular e inativa I κ B quinase (enzima que fosforila IKK que por sua vez libera a enzima NF- κ B) não permitindo a migração de NF- κ B para o núcleo para transcrição do sinal para formação de moléculas de adesão e subsequente ampliação do processo inflamatório.

Estudos de Paula et al. (2015) demonstraram diminuição dos níveis de IL1 β e TNF- α em um modelo de inflamação aguda após tratamento com GNP's injetadas no espaço pleural de ratos wistar. Segundo De Araújo et al. (2018) encontraram uma redução de 49,3% na migração de leucócitos no tecido pulmonar, melhorando a atividade anti-inflamatória em modelo murino. Além

disso, Sumbayev et al. (2013) GNPs estabilizadas por citrato diminuíram, de maneira dependente do tamanho, a resposta celular induzida por IL-1 β *in vitro* e *in vivo*, este estudo mostrou que a atividade anti-inflamatória das GNPs está associada com sua capacidade de interagir fisicamente com a IL-1 β extracelular e dessa forma neutralizar sua ligação com seu receptor de membrana inibindo sua cascata de sinalização inflamatória.

Dos Santos Haupenthal et al. (2020) demonstrou que a terapia com GNP foi eficaz na redução da atividade inflamatória aguda, resposta e produção de ERO's, além de proteger das alterações morfológicas o tecido pulmonar após exposição sistêmica ao LPS.

As nanopartículas de ouro inibem a formação de espécies reativas de oxigênio, ligando-se e neutralizando diretamente os radicais livres, sendo esse efeito dependente do tamanho e dosagem da molécula, além disso tem efeitos nas vias de sinalização apoptóticas, agindo como antioxidante reduzindo os danos celulares (Barathmanikanth et al. 2010; Dos Santos Haupenthal et al. 2020; Haupenthal et al. 2020).

Tendo em vista, o acima abordado, nós hipotetizamos que o tratamento com nanopartículas de ouro é capaz de reduzir a cascata inflamatória e formação EROs no tecido pulmonar, sem apresentar genotoxicidade em animais expostos agudamente à fumaça de cigarro industrial.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos terapêuticos da administração intranasal de diferentes doses de nanopartículas de ouro sobre parâmetros inflamatórios, de estresse oxidativo, histológicos e de genotoxicidade após exposição aguda à fumaça de cigarro industrial no tecido pulmonar.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos do tratamento com nanopartículas de ouro sobre os níveis proteicos de TNF- α em tecido pulmonar após administração de diferentes doses de GNPs administradas intranasal;
- Avaliar os efeitos do tratamento com nanopartículas de ouro sobre a produção de oxidantes (DCF e NO) no tecido pulmonar após administração de diferentes doses de GNPs administradas intranasal;
- Analisar o índice e a frequência de danos ao DNA em tecido pulmonar, fígado e sangue após exposição à fumaça de cigarro e nanopartículas de ouro;
- Avaliar os efeitos do tratamento com nanopartículas de ouro sobre parâmetros histológicos pulmonar após administração de diferentes doses de GNPs administradas intranasal;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados 30 camundongos machos da linhagem Swiss pesando entre 25 e 35g, com 2 meses de idade, provenientes do Biotério Central da UNESC. Os animais foram alojados em gaiolas plásticas (42 x 34 x 17 cm), com condição controlada de temperatura ($22 \pm 1^{\circ}\text{C}$) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas, fase clara das 7:00 às 19:00h), e com livre acesso a água e comida. Os procedimentos empregados para a realização deste trabalho, obtiveram aprovação do Comitê de Ética no uso de animais (CEUA) da UNESC, sob o parecer nº 065/2015-1.

3.2 Desenho experimental

Os 30 animais foram randomicamente divididos em cinco grupos com seis indivíduos: Grupo 1 (Sham); Grupo 2 (Fumaça de Cigarro - FC); grupo 3 (FC + GNP 2,5mg/L); grupo 4 (FC + GNP 7,5mg/L) e grupo 5 (FC + GNP 22,5mg/L).

Grupo 1 (Sham) – Animais submetidos à exposição de ar ambiente.

Grupo 2 (Fumaça de Cigarro (FC)) – Animais submetidos à exposição aguda de fumaça de cigarro industrial.

Grupo 3 (FC + GNP 2,5 mg/L) – Animais submetidos à exposição aguda de fumaça de cigarro industrial e à dose intranasal de 2,5 mg/L de GNP.

Grupo 4 (FC + GNP 7,5 mg/L) – Animais submetidos à exposição aguda de fumaça de cigarro industrial e à dose intranasal de 7,5 mg/L de GNP.

Grupo 5 (FC + GNP 22,5 mg/L) – Animais submetidos à exposição aguda de fumaça de cigarro industrial e à dose intranasal de 22,5 mg/L de GNP.

Os animais foram expostos ao cigarro comercial com filtro (Marlboro vermelho) alocados em uma câmara de inalação de acrílico (40x30cm por 25cm de altura) dentro de uma capela de exaustão durante 5 dias consecutivos. A exposição foi realizada usando 4 cigarros por sessão, sendo 3 sessões/dia, totalizando 12 cigarros/dia. Os cigarros foram acoplados a uma seringa de

plástico de 60 mL para captação da fumaça e imediatamente expelida dentro da caixa. A partir da injeção de fumaça para o interior da caixa, a exposição à fumaça de cigarro teve duração de 6 minutos com a tampa da caixa acrílica fechada, ao final deste tempo, a tampa foi removida, e o exaustor da capela ligado para eliminação da fumaça por 1 minuto seguido de uma nova exposição à queima do cigarro até totalizar os 4 cigarros de cada sessão. Os animais do grupo sham permaneceram na caixa inalatória durante o período experimental, porém expostos somente ao ar ambiente.

A injeção de solução intranasal de GNP foi realizada ao final de cada dia, logo após a última exposição à fumaça de cigarro industrial, respeitando a dose, conforme randomização. Para a aplicação da solução, foi feita a contenção do camundongo, que consistiu em sua retirada da gaiola, suspendendo o animal pela base da cauda, e a seguir, rapidamente foi apoiado em uma superfície na qual ele possa se agarrar, provendo maior firmeza para as contenções posteriores. Após, pressionou-se levemente o animal sobre a superfície, segurando, primeiramente a pele da região dorso-cervical, entre os dedos indicador e polegar. Em seguida fixamos sua cauda entre os outros dedos e a palma da mão, para a limitar totalmente seus movimentos. A partir deste momento, com o animal imobilizado, e com auxílio de uma pipeta, realizamos a administração intranasal de 50µl de solução fisiológica (cloreto de sódio 0,9%) nos grupos sham e FC e 50ul de solução contendo as doses de GNP nas concentrações de 2,5 mg/L, 7,5 mg/L e 22,5 mg/L nos grupos que receberam FC + GNP como tratamento.

Vinte e quatro horas após a última inalação e administração das GNPs os animais foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical e os pulmões direito de 6 animais por grupo foram cirurgicamente extraídos e perfundidos com paraformaldeído 4%, e imersos em solução fixadora de paraformaldeído 10% (PFA) por 24 horas, para posterior processamento histológico e análises histopatológicas. O pulmão esquerdo foi homogeneizado em tampão específico e usado para análises bioquímicas e moleculares.

3.3 Síntese da GNP

GNP's de tamanhos médios de 20 nm foram sintetizadas como descrito por Turkevich, Stevenson, and Hillier (1951) com pequenas modificações, a partir de redução química do precursor metálico ácido tetracloroáurico (HAuCl_4) (Sigma-Aldrich, MO, EUA) com o agente redutor e estabilizante citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Nuclear, SP, Brasil). Inicialmente, 100 mL de 4 mM de ácido tetracloroáurico, foram transferidos para um balão de fundo redondo, a solução aquecida até 90 °C e sob agitação a 700 rpm. Solução de citrato de sódio (38mM), previamente preparada, foi então adicionada 5mL no meio reacional, o sistema mantido à temperatura descrita, agitando a vigorosamente durante 20 minutos. A solução adquire coloração correspondente a seu tamanho. Após a síntese, a solução de GNP foi caracterizada empregando-se a técnica de espectroscopia no ultravioleta-visível (UV-Vis), via monitoramento da banda de superfície de plasmon ressonante (SPR), usando um espectrofotômetro modelo UV-1800, difração de raios-x, através do equipamento de LAB-X, modelo XDR – 6000 (Shimadzu). Para a espectrometria de UV-visível, a medição da banda de SRP, foi realizada a temperatura ambiente num espectrofotômetro utilizando uma cubeta de quartzo contendo uma alíquota de 1 mL da solução, sendo que o espectro eletrônico das soluções foi monitorado diariamente ao longo de uma semana no intuito de revelar qualquer alteração do comprimento de onda na máxima absorção, obtendo-se valor de 532 nm para AuNP de 20 nm. Para medidas de difratometria de raios-x (DRX), uma alíquota de 9 mL da solução de GNP foi centrifugada a 10.000 rotações por minuto por 10 minutos. O sobrenadante é removido e o material sedimentado transferido para um porta amostra e seco em estufa. O material foi caracterizado com os seguintes parâmetros: Comprimento de onda da radiação do tubo de cobre: 1.54056 Å, voltagem de 30 kV, corrente 30 mA. Velocidade de varredura: 2°/min, ao passo de 0.02°, entre 20-80° (Balasubramanian et al. 2010). O diâmetro médio das GNP foi calculado usando a equação de Scherrer $2\theta = 38^\circ$ (Yan et al. 2005). Onde, D é Diâmetro médio, K = 0,94, uma constante característica das partículas esféricas, λ é comprimento onda (raios-x usado): 1,54056, b: Largura da banda a meia altura (total na metade máxima do pico em radianos) e θ : Ângulo de Bragg (do pico de 100% de intensidade) (Balasubramanian et al. 2010).

A concentração de ouro foi mensurada por espectrofotometria de absorção atômica (Varian model AA 240Z; Varian Medical Systems, Inc., Palo Alto, CA, USA) obtendo concentração de 70 mg/L. A análise do Potencial Zeta, (ZetaPALS; Brookhaven Instruments, Nova Iorque, EUA) foi utilizado para medir o potencial Zeta das GNP. A temperatura foi mantida a 25 °C. As concentrações de ouro (2,5mg/L, 7,5mg/L e 22,5mg/L) nas soluções de GNPs foram determinadas por espectrometria de absorção atômica (EAA) utilizando um espectrofotômetro modelo AA240 FS-FAST SEQUENTIAL ATOMIC ABSORPTION SPECTROMETER marca VARIAN.

3.4 Análise Histológica

Vinte e quatro horas após a última aplicação dos tratamentos os animais foram anestesiados e submetidos à eutanásia por deslocamento cervical e os pulmões direito de 6 animais por grupo foram cirurgicamente extraídos e imersos em solução fixadora de paraformaldeído 10% (PFA) por 24 horas, e perfundidos com solução de paraformaldeído a 4% (PFA) em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4) a uma pressão de 25cm de H₂O durante dois minutos através de um cateter traqueal e posteriormente será removido e pesado. Os pulmões inflados foram fixados por 48h antes de serem incorporados na parafina. Cortes sagitais seriais de 5µm serão obtidos para análises histológicas, os focos inflamatórios foram realizados com hematoxilina-eosina (H&E). A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico (Eclipse 50i, Nikon, Melville, NY, EUA), com aumento de 200x. As imagens foram registradas com auxílio da câmera Nikon (Sight DS-5M-L1, Melville, NY, EUA) e analisadas utilizando o software NIH ImageJ 1.36b (NIH, Bethesda, MD, EUA), considerando a coloração nuclear das células inflamatórias (H&E), macrófagos e neutrófilos serão quantificados nos alvéolos. Em cada grupo, 30 campos de 26.000 µm² (10 campos aleatórios de 3 diferentes sessões) do pulmão direito foram analisados. O número de macrófagos e neutrófilos (células/mm²) serão contadas usando a imagem do campo microscópico em objetiva 40x de um microscópio Olympus BH-2 equipado com uma ocular. O enfisema pulmonar será quantificado baseado no grau de

destruição alveolar como determinado pela medição do intercepto linear médio (L_m , diâmetro alveolar médio) em micrometros (Saetta et al., 1985). Para este fim, 16 campos de cada slide serão contados e observados com uma ampliação de 2000x através de um retículo acoplado ao monitor. Para obter amostras de pulmão uniformes e proporcionais, 18 campos (seis campos não condicentes em três diferentes sessões) serão aleatoriamente identificados e analisados usando um vídeo microscópico (microscópio ZeissAxioplan com objetiva 20x e uma câmera de vídeo colorida JVC ligada a um monitor colorido Sony Trinitron; Carl Zeiss, Alemanha) e um sistema de teste cicloide sobrepostas na tela do monitor. A referência em termos de volume será estimada pela contagem de pontos usando o teste de sistema de pontos (PT) (Weibel, 1979). The points hitting the airspaces (PP) serão contados para estimar a densidade do volume (V_v) destas estruturas ($V_v = PP/PT$). A área total de 1.3 mm² serão analisadas para determinar a densidade do volume do alvéolo ($V_v[air]$) e as fibras elásticas ($V_v[elastic\ fibers]$) em cortes corados com hematoxilina e eosina (H/E). Dois pesquisadores irão realizar todas as medições e contar as áreas não identificadas.

3.5 Análises bioquímicas

3.5.1 Quantificação por ELISA

A determinação da concentração da citocina pró inflamatória TNF- α foi realizada por Imunoensaio de imunoabsorbância enzimática (ELISA) sanduiche indireto (DuoSet ELISA) utilizando amostras das estruturas avaliadas em duplicatas. As placas de ELISA foram sensibilizadas com um anticorpo de captura específico (diluição 1:100), deixando *overnight* a 4 °C. No dia posterior, as placas foram lavadas com tampão de lavagem (Tween 20 e NaCl), bloqueadas (ELISA / ELISPOT Diluent) e incubadas por uma hora a temperatura ambiente. As amostras dos tecidos de interesse foram então pipetadas em duplicata na placa (100 microlitros), sobre seus respectivos anticorpos de captura. Após duas horas de incubação, as placas passaram novamente pela etapa de lavagem, afim de remover-se as ligações inespecíficas.

Posteriormente, adicionou-se o anticorpo de detecção, o qual se liga aos antígenos da amostra formando assim uma espécie de “sanduiche” de anticorpo e amostra. Após período de incubação a temperatura ambiente e posterior etapa de lavagem, foi adicionado 100 microlitros de uma solução contendo uma enzima peroxidase (HRP). Sob esta solução, adicionou-se um substrato cromogênico, o Tetrametilbenzidina (TMB), a qual na presença da HRP, emite uma coloração azul específica. Para parar esta reação, serão utilizados 50 microlitros por poço de ácido sulfúrico diluído. A concentração de TNF- α , foi determinada via leitura da absorbância (450 nm) em espectrofotômetro (BIO-RAD, 680).

3.5.2 Espécies reativas

A produção de hidroperóxidos foi determinada pela formação intracelular de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA) a partir da oxidação do diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA) por ERO's de acordo com o método descrito anteriormente por Dong, Sulik, and Chen (2010), com algumas modificações.

A produção de NO foi avaliada espectrofotometricamente através do metabólito estável nitrito. Para mensurar o conteúdo de nitrito, as amostras foram incubadas com reagente Griess (1% sulfanilamida e 0,1% de N-1 (naphthyl) ethylenodiamina) em temperatura ambiente por 10 minutos e a absorbância foi medida a 540nm. O conteúdo de nitritos foi calculado com base numa curva padrão de 0 a 100 nM realizada com o metabólito nitrito de sódio (NaNO_2). Os resultados foram calculados em μmol Nitrito/mg proteína (Chae et al. 2004).

3.5.3 Dano ao DNA (ensaio cometa)

Para a realização do ensaio cometa foram utilizadas as seguintes estruturas biológicas: sangue, pulmão, coração e fígado. O ensaio cometa foi realizado sob condições alcalinas, conforme descrito por Singh et al. (1988), com algumas modificações sugeridas por Tice et al. (2000). O sangue foi coletado e colocado em microtubos heparinizados e refrigerados, e as amostras de pulmão e fígado foram dissecadas e imersas em tampão fosfato (PBS) refrigerado. Em seguida foram individualmente homogeneizadas com o auxílio de uma seringa, através do movimento de vai e vem, a fim de obter uma suspensão celular. As

células do sangue (alíquotas de 5 uL) e as células obtidas da dissociação de tecidos (alíquotas de 25 uL) foram embebidas em agarose de baixo ponto de fusão (0.75%, w/v, 95 uL ou 75 uL, respectivamente) e a mistura foi adicionada a uma lâmina de microscópio pré-coberta com agarose de ponto de fusão normal (1,5%), cobrindo posteriormente com uma lamínula e levadas, então, à geladeira por aproximadamente 5 minutos a 4°C para solidificação. Logo após, as lamínulas foram cuidadosamente retiradas e as lâminas imersas em tampão de lise (2,5M NaCl, 100mM EDTA e 10mM Tris, pH 10,0-10,5, com adição na hora do uso de 1% de Triton X – 100 e 10% de DMSO) a 4°C por um período mínimo de 1 hora e máximo de 2 semanas. Após este período, as lâminas foram incubadas em tampão alcalino (300mM NaOH e 1mM EDTA, pH>13) por 20 minutos para o desenovelamento do DNA, a corrida eletroforética, foi realizada no mesmo tampão nas seguintes condições: a 25v e 300mA por 15 minutos. Todas estas etapas foram realizadas sob luz indireta, fraca e amarela. Posteriormente as lâminas foram neutralizadas com 0,4M Tris (pH 7,5) e, ao final, o DNA foi corado com 10 mg/mL de solução de brometo de etídio (Sigma Brasil, 1239-45-8) para posterior análise em microscópio de fluorescência com aumento de 400x. Foi realizada avaliação de 100 células por indivíduo e por tecido (50 células em cada lâmina duplicada). Tais células foram avaliadas visualmente, sendo classificadas em cinco classes, de acordo com o tamanho da cauda, sendo a classificação para ausência de cauda, até 4 para o comprimento máximo de cauda (Collins et al. 1997). Desta forma, tem-se um Índice de Danos (ID) para cada animal variando de zero ($100 \times 0 = 0$; 100 células observadas completamente sem danos) a 400 ($100 \times 4 = 400$; 100 células observadas com dano máximo). Calcula-se a frequência de danos (FD em %) em cada amostra com base no número de células com cauda versus o número de células sem cauda. As diretrizes internacionais e recomendações para o ensaio do cometa consideraram que o escore visual de 70 cometas é um método de avaliação bem validado. Ele tem uma alta correlação com a análise de imagem por computador (Collins et al. 1997). Foram utilizados controles negativos e positivos para cada teste de eletroforese a fim de assegurar a confiabilidade do procedimento. Todas as lâminas foram codificadas para análise às cegas.

3.6 Análises estatísticas

Os dados foram expressos em média e erro padrão médio (EPM) e analisados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA) one-way, seguido pelo teste post hoc Tukey. O nível de significância estabelecido para o teste estatístico foi de $p < 0,05$. Foi utilizado o Graph pad prisma 5 (Statistical Graph Pad Prisma) como pacote estatístico.

4. RESULTADOS

4.1 Análise histológica

Na figura 3 podemos observar imagens representativas de cortes histológicos do pulmão, grupo FC, FC + GNP 2,5 mg/L, FC + GNP 7,5 mg/L e FC + GNP 22,5 mg/L respectivamente. Através das imagens histológicas foram feitas quantificações da média de células inflamatórias (figura 3A) e a média do diâmetro alveolar (figura 3B).

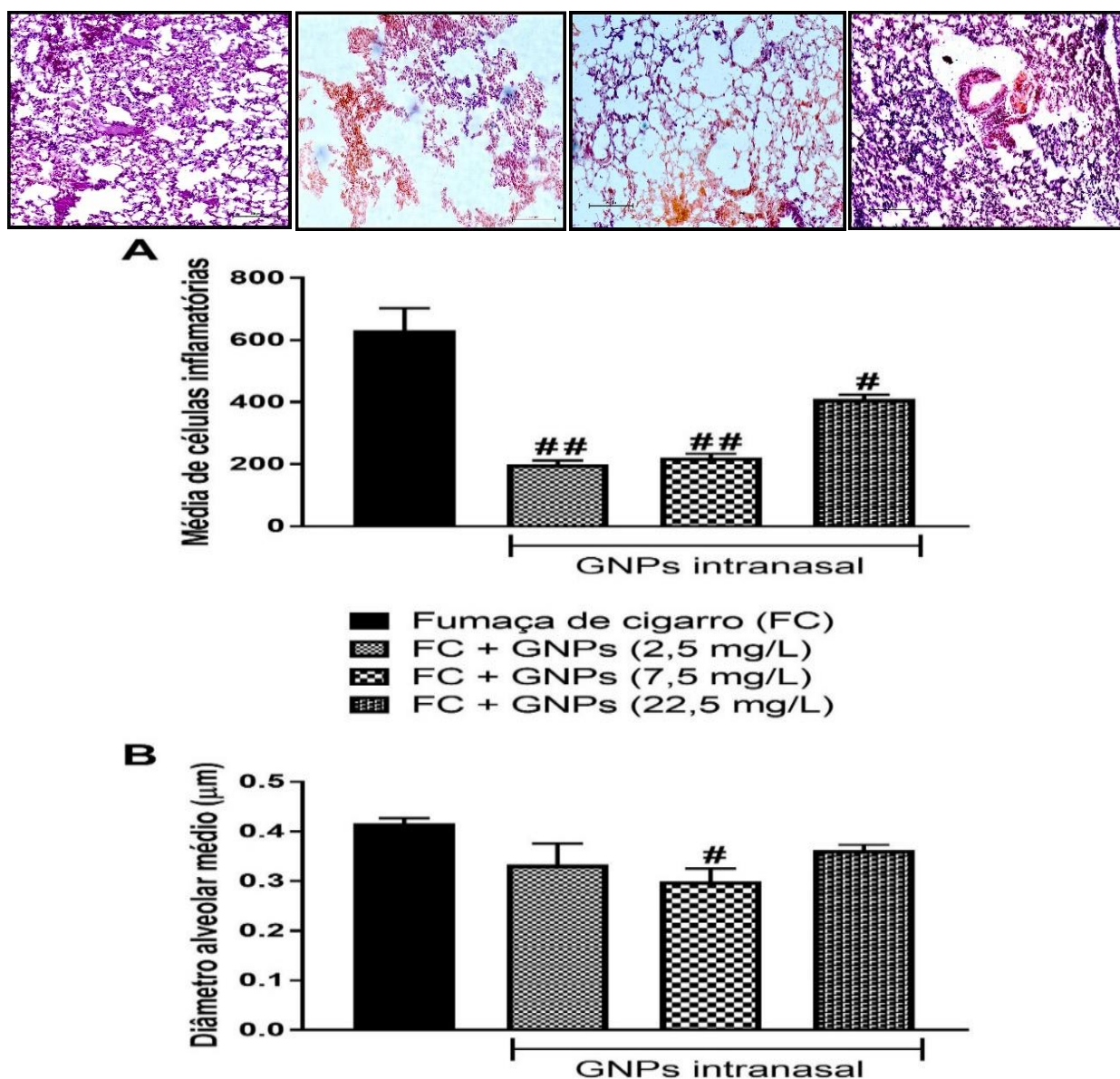


Figura 3: Imagens representativas de cortes histológicos de tecido pulmonar corados com (H&E) mostrando os efeitos de três distintas doses de GNP intranasal sobre o número médio de células inflamatórias (A) e diâmetro alveolar médio (B). Os dados são apresentados em Média $\pm$ EPM, no qual: # $p < 0,01$ v.s Grupo Fumaça de cigarro (FC) e ## $p < 0,0001$ v.s Grupo Fumaça de Cigarro (FC) (ANOVA de uma via seguido de teste *post hoc* de Tukey).

Pode-se observar que o grupo FC + GNP 22,5 mg/L teve redução significativa comparada ao grupo FC ($p<0,01$) e os grupos FC + GNP 2,5 mg/L e FC + GNP 7,5 mg/L obtiveram uma diferença significativa ainda maior na redução da média de células inflamatórias ($p<0,0001$) (figura 3A). Quando observamos o diâmetro médio alveolar (figura 3B) o grupo FC + GNP 7,5 mg/L teve redução significativa ($p<0,01$) quando comparado ao grupo FC.

4.2 Análise de Genotoxicidade Sanguínea e Hepática

Inicialmente avaliamos a genotoxicidade da exposição aguda a fumaça de cigarro e as GNPs através do teste cometa, onde foram observados a frequência e o índice de danos em células do plasma sanguíneo (Figura 4A e 4B) e células hepáticas (figura 4C e 4D).

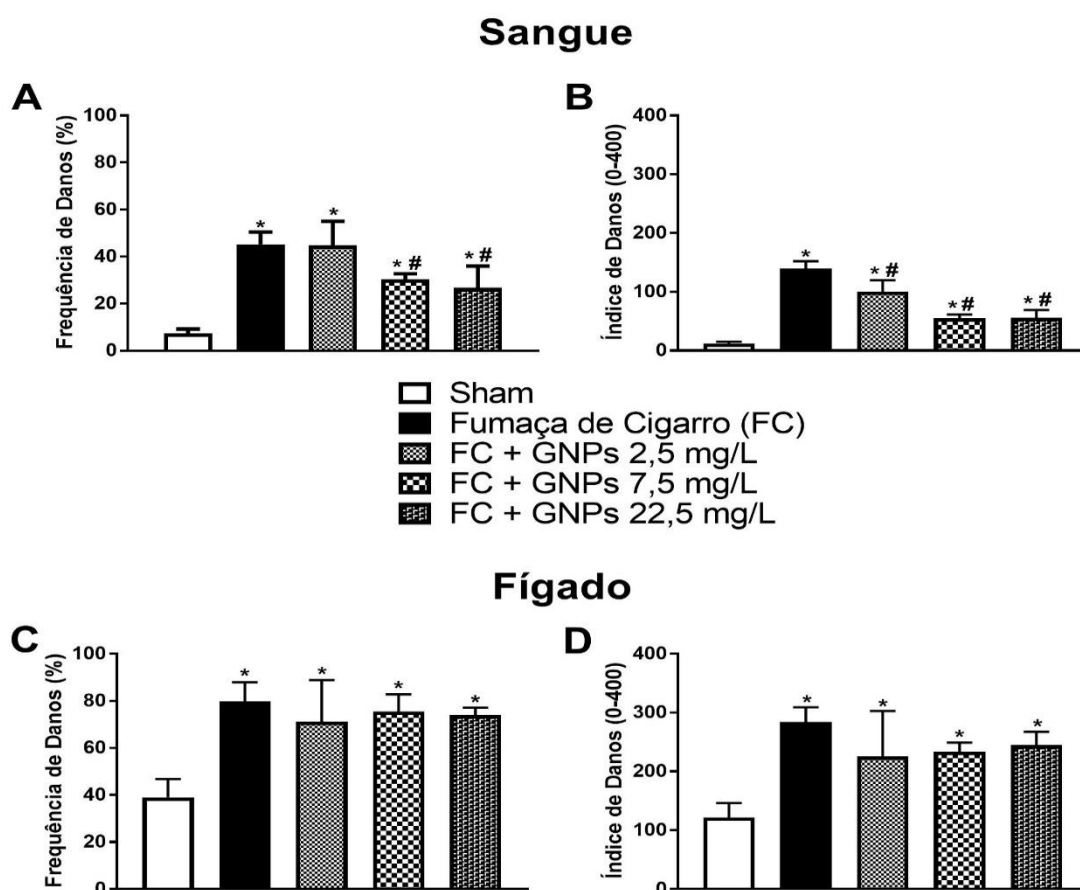


Figura 4: Efeitos de três distintas doses de GNP intranasal sobre a frequência e índice de danos ao DNA no plasma sanguíneo (A e B) e células do tecido hepático (C e D). Os dados são apresentados em Média $\pm$ EPM, no qual: * $p<0,05$ v.s Grupo Sham e # $p<0,05$ v.s Grupo FC (ANOVA de uma via seguido de teste *post hoc* de Tukey).

Na figura 4A observamos um aumento significativo da frequência de danos ao DNA em células do plasma sanguíneo nos grupos FC, FC + GNP 2,5 mg/L, FC + GNP 7,5 mg/L e FC + GNP 22,5 mg/L quando comparados ao grupo sham. Já os grupos FC + GNP 7,5 mg/L e FC + GNP 22,5 mg/L mostraram redução da frequência de danos ao DNA quando comparados ao grupo FC. Na figura 4B, houve aumento significativo do índice de danos ao DNA nos grupos FC, FC + GNP 2,5 mg/L, FC + GNP 7,5 mg/L e FC + GNP 22,5 mg/L quando comparados ao grupo sham. Nos grupos FC + GNP 2,5 mg/L, FC + GNP 7,5 mg/L e FC + GNP 22,5 mg/L observamos redução significativa dos índices de danos ao DNA quando comparados ao grupo FC.

Já nas figuras 4C e 4D observamos as frequências e índices de danos ao DNA em células hepáticas, onde houve aumento significativo da frequência de danos nos grupos FC, FC + GNP 2,5 mg/L, FC + GNP 7,5 mg/L e FC + GNP 22,5 mg/L quando comparados ao grupo sham.

4.3 Avaliação de citocina inflamatória TNF- α

Na Figura 5 estão representados os níveis proteicos da citocina pró inflamatória TNF- α . Houve aumento significativo nos níveis de TNF- α no grupo FC quando comparado ao grupo sham. Já os grupos FC + GNP 2,5 mg/L, FC + GNP 7,5 mg/L, FC + 22,5 mg/L tiveram redução significativa deste marcador quando comparados ao grupo FC.

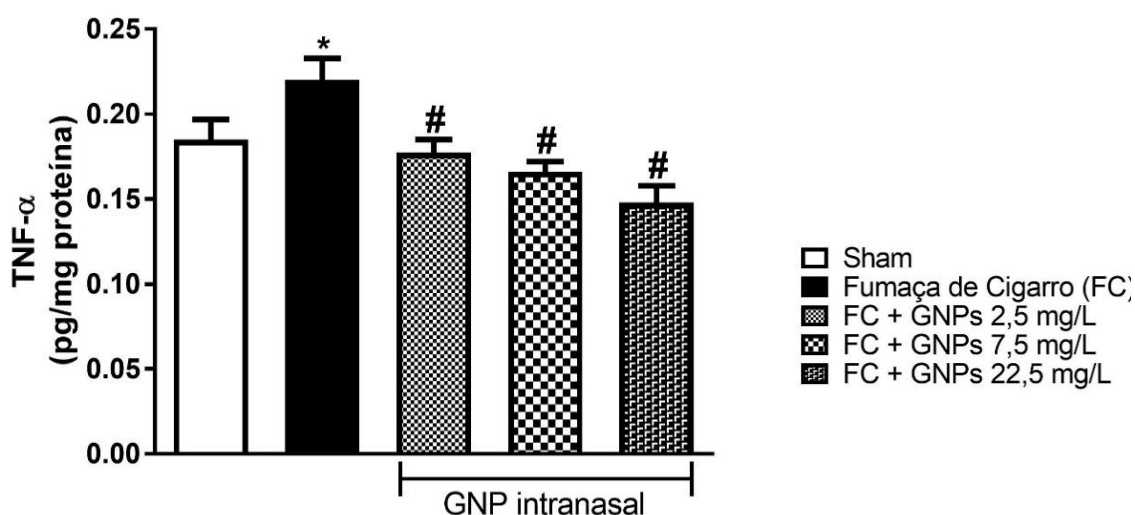


Figura 5: Efeitos de três distintas doses de GNP intranasal sobre a citocina pró-inflamatória TNF- α . Os dados são apresentados em Média $\pm$ EPM, no qual: * $p < 0,05$ v.s Grupo Sham e # $p < 0,05$ v.s Grupo FC (ANOVA de uma via seguido de teste *post hoc* de Tukey).

4.4 Determinação intracelular de ERO e NO

Níveis de DCF e nitrito foram investigados como parâmetros de produção de oxidantes (figura 6). Os resultados demonstram aumento significativo nos níveis de DCF nos grupos FC e FC + GNP 22,5 mg/L quando comparados ao grupo Sham. Nos grupos FC + GNP 2,5 mg/L e FC + GNP 7,5 mg/L houve diminuição significativa quando comparado ao grupo FC (figura 6A). A figura 6B representa os níveis de nitrito, no grupo FC ocorreu aumento significativo quando comparado ao grupo Sham. Nos grupos FC + GNP 2,5 mg/L, FC + GNP 7,5 mg/L e FC + GNP 22,5 mg/L é observada redução significativa nos níveis de NO quando comparados ao grupo FC

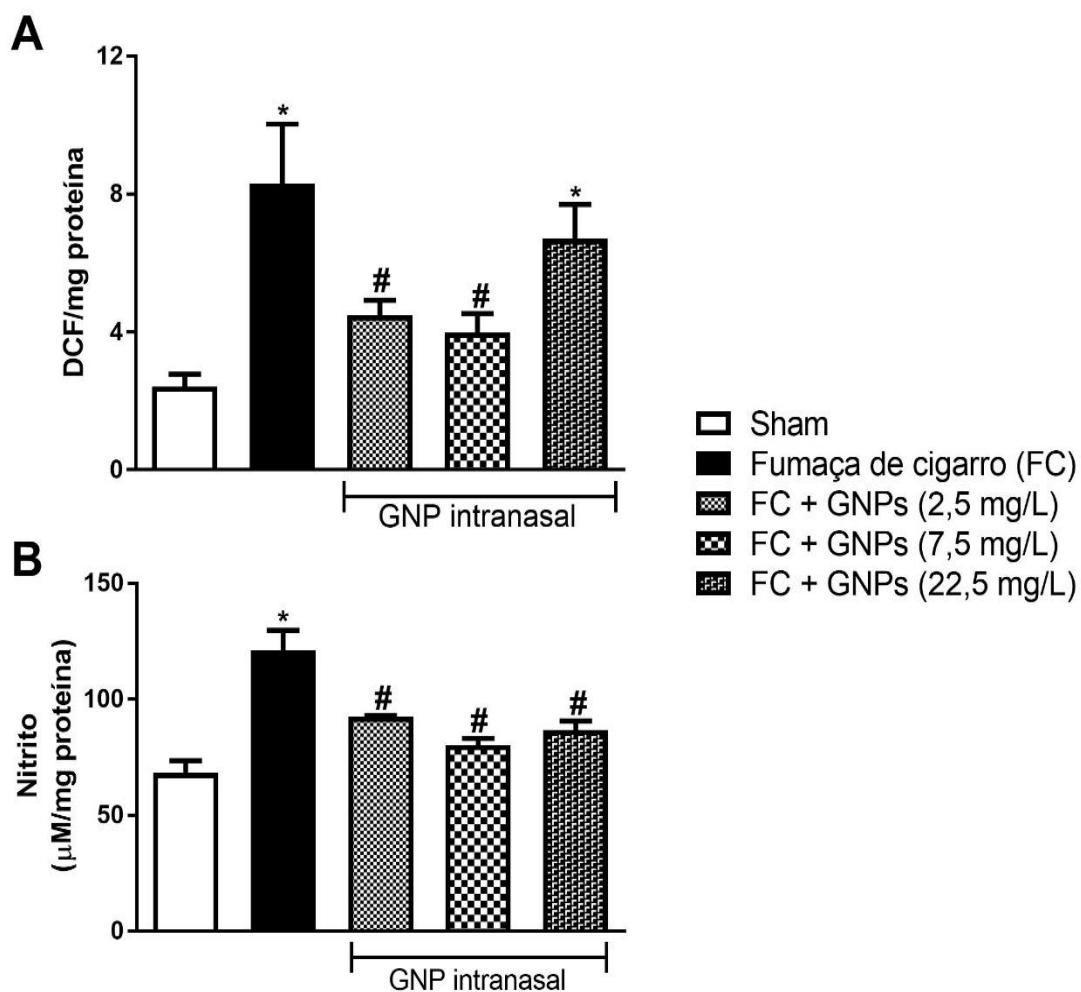


Figura 6: Efeitos de três distintas doses de GNP intranasal sobre os níveis de DCF (A) e Nitrito (B). Os dados são apresentados em Média $\pm$ EPM, no qual: * $p < 0,05$ v.s Grupo Sham e # $p < 0,05$ v.s Grupo Cigarro industrial (CI) (ANOVA de uma via seguido de teste *post hoc* de Tukey).

4.5 Análise da genotoxicidade pulmonar

Os danos ao DNA de células pulmonares foram avaliados através de ensaio cometa, onde foram observados a frequência (figura 7A) e o índice de danos (figura 7B). Um aumento na frequência de danos ao DNA no pulmão é observado nos grupos FC, FC + GNP 2,5 mg/L, FC + GNP 7,5 mg/L e FC + GNP 22,5 mg/L quando comparados ao grupo sham, quando comparados ao grupo FC, os grupos que receberam tratamento com GNP em três diferentes doses obtiveram redução, porém sem apresentar significância estatística.

No índice de danos ao DNA houve aumento significativo nos grupos FC, FC + GNP 2,5 mg/L, FC + GNP 7,5 mg/L e FC + GNP 22,5 mg/L quando comparados ao grupo sham. Entretanto, no grupo FC + GNP 7,5 mg/L houve redução significativa do índice de danos ao DNA quando comparados ao grupo FC, enquanto os grupos FC + GNP 2,5 mg/L e FC + GNP 22,5 mg/L obtiveram queda dos índices de danos, porém sem diferença estatística quando comparados ao grupo FC.

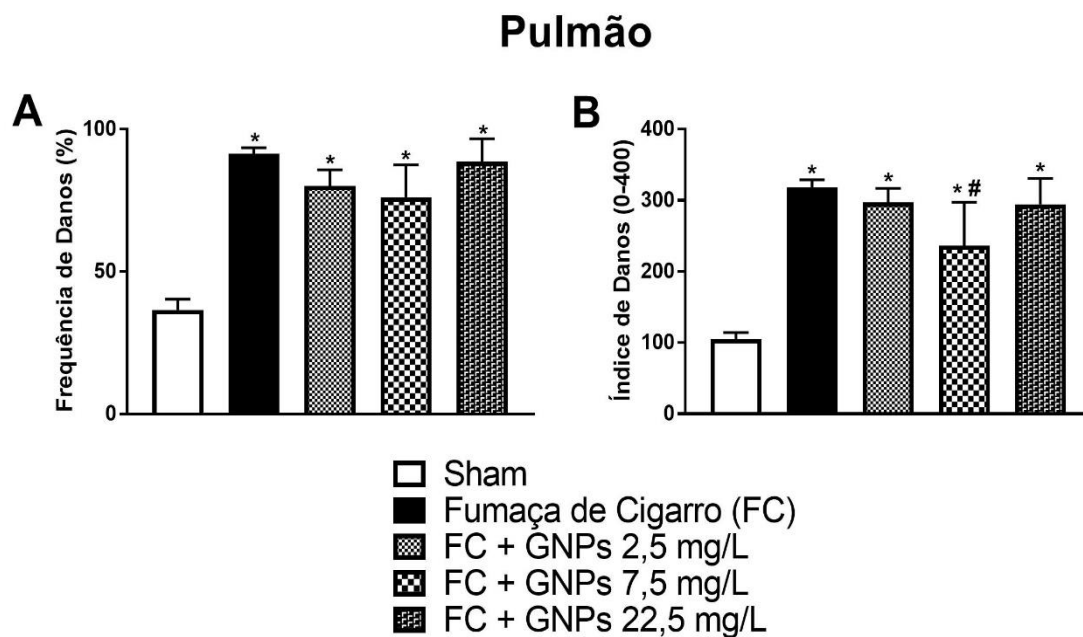


Figura 7: Efeitos das diversas doses de GNP intranasal sobre a frequência (A) e índice (B) de danos ao DNA no tecido Pulmonar. Os dados são apresentados em Média $\pm$ EPM, no qual: * $p < 0,05$ v.s Grupo Sham e # $p < 0,05$ v.s Grupo Cigarro industrial (CI) (ANOVA de uma via seguido de teste *post hoc* de Tukey).

5 DISCUSSÃO

A exposição à fumaça do cigarro promove danos ao tecido pulmonar, e associados à ocorrência de processo inflamatório, estresse oxidativo e danos ao DNA, podem levar a patologias pulmonares e sistêmicas relacionadas ao tabagismo, como a DPOC. Mesmo existindo algumas terapias farmacológicas para o tratamento dessa patologia, ela ainda não é passível de cura, sendo o desenvolvimento de novas terapias, a compreensão dos mecanismos celulares e moleculares do processo inflamatório de suma importância para reduzir os índices de mortalidade e morbidade relacionados a patologia (Kennedy-Feitosa et al. 2016; Dos Santos Haupenthal et al. 2020). Recentemente o uso de GNPs tem apresentado efeitos promissores no tratamento de doenças que apresentem inflamação e estresse oxidativo (Muller et al. 2017). De forma a estudar uma nova abordagem de tratamento para os prejuízos advindos da exposição à fumaça do cigarro, este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos de diferentes doses de nanopartículas de ouro sobre parâmetros inflamatórios, dano oxidativo, histológicos e genotoxicidade após exposição aguda à fumaça de cigarro industrial.

A condição inflamatória gerada pela fumaça de cigarro, com ativação de macrófagos M1 e secreção de inúmeras citocinas pró-inflamatórias, aliados ao um alto índice de danos oxidativos contribui para destruição do tecido pulmonar (Wang et al. 2020). Os achados histológicos deste estudo demonstram que o modelo de exposição aguda à fumaça de cigarro gera aumento da média de células inflamatórias e do diâmetro alveolar, isso leva ao estreitamento generalizado do lúmen e obstrução das pequenas vias aéreas (Barnes 2008, 2019). Além disso, a resposta inflamatória induz à formação de EROs, os quais liberam mediadores fibrogênicos, como o TGF- β , que estimula a produção de colágeno resultando em fibrose e aumento do diâmetro alveolar e peribronquiolar, esses fibroblastos também liberam quimiocinas, como a CXCL8, que recrutam neutrófilos fornecendo uma carga adicional de citocinas inflamatórias e EROs (Carnevali et al. 2003; Barnes 2017). Esse aumento adicional de citocinas inflamatórias e desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, com aumento de oxidação gera danos diretos a lipídeos, proteínas, ácidos nucleicos e componentes da matriz, gera remodelação e

destruição patológica do tecido. Os macrófagos, fibroblastos e o epitélio pulmonar geram aumento da expressão de proteases e metaloproteases de matriz (MMP), que são responsáveis pela degradação dos constituintes da matriz extracelular (MEC), com extensa degradação de fibras colágenas e elastina, níveis aumentados de EROs também contribuem para inativação de antiproteases, como α 1-antitripsina levando ao enfisema pulmonar (Strzelak et al. 2018; Andrault et al. 2019). A liberação de radicais livres leva a um aumento da apoptose, induzido pela expressão do RNAm de p53, bax, caspase-3 e 9, levando a danos alveolares na forma de colapso alveolar e infiltração intensa de células inflamatórias (Elbakary et al. 2018).

As GNPs são usadas em pesquisas há muito tempo, principalmente por sua capacidade anti-inflamatória e antioxidante (Silveira, Venancio, et al. 2014; dos Santos Tramontin et al. 2020; Haupenthal et al. 2020). Os resultados do presente estudo mostram que grupos tratados com todas as três doses de GNPs apresentaram redução significativa na média de células inflamatórias em cortes histológicos, principalmente nos grupos FC + 2,5 mg/L e FC + GNP 7,5 mg/L. Já o diâmetro alveolar foi reduzido significativamente apenas no grupo FC + GNP 7,5 mg/L.

Para avaliar a genotoxicidade da fumaça de cigarro e das diferentes doses de GNPs, 2,5, 7,5 e 22,5 mg/L, foram verificados a frequência e os índices de danos ao DNA através de ensaio cometa em plasma sanguíneo e tecido hepático (figura 4). O resultado mostra que GNPs esféricas estabilizadas por citrato e com tamanho de 20 nm administradas em doses de 2,5, 7,5 e 22,5 mg/L por 5 dias consecutivos não adicionaram danos ao DNA, pois esses grupos não apresentaram maiores índices de danos quando comparados ao grupo FC. No plasma sanguíneo, além de não adicionar mais danos ao DNA, as GNPs reduziram significativamente o índice e a frequência desses danos.

Em tabagistas as concentrações plasmáticas de vários metais pesados tóxicos são aumentados, ele são responsáveis por efeitos genotóxicos do cigarro ao DNA humano, como indução da quebra de dupla fita e inibição do reparo ao DNA, o que corrobora com os achados do presente estudo, que demonstra aumento de índice e frequência de danos ao DNA no grupo exposto à fumaça de cigarro (Alsaad et al. 2019). Já a redução de danos ao DNA nas células do plasma sanguíneo encontrada no presente estudo pode ser explicada pela

interação entre os constituintes celulares e as GNPs. O sangue é composto por células sanguíneas (glóbulos vermelhos, glóbulos brancos e plaquetas) e plasma. As GNPs reduzidas com citrato possuem grande interação com leucócitos, eritrócitos e plaquetas aumentando a adsorção (Zheng et al. 2019; Liu et al. 2019). Sendo assim, as GNPs tendem a demonstrar maior interação com células de defesa devido a hemocompatibilidade, formando uma proteína corona rica em proteínas envolvidas na imunidade humoral, o que aumenta a capacidade das células de defesa, combatendo agentes patológicos e células danificadas (Zheng et al. 2019). Estes dados corroboram com os achados do presente estudo, sugerindo que as GNPs são capazes de reduzir os danos ao DNA causados pelo acúmulo de radicais livres e/ou citocinas pró-inflamatórias.

O efeito protetor obtido pela utilização de GNPs pode ser justificado pela não interação da citocina IL1 β com seu receptor de membrana diminuindo a cascata pró-inflamatória, e consequentemente reduzindo lesões celulares por excesso de geração de EROs e posteriores danos ao DNA no tecido hepático (Pan et al. 2009; Sumbayev et al. 2013). A análise dos resultados das células hepáticas ratifica esta afirmativa demonstrando menor dano ao DNA nos grupos tratados com GNPs, quando comparados com o grupo exposto somente à fumaça do cigarro.

Quanto à biodistribuição, estudos mostram que a grande maioria das GNPs se acumulam em baço e fígado, mesmo quando há uma estratégia de direcionamento aplicada a um órgão alvo (Xiong et al. 2018). Apesar disso, mesmo com evidências de acúmulo de GNPs em tecido hepático, Downs et al. (2012) demonstraram *in vivo*, via teste cometa, que diversos tamanhos de GNPs (2, 20 e 200 nm) com dose máxima de 50 mg/kg não induziram ao aumento de danos ao DNA em células hepáticas, pulmonares ou em glóbulos brancos do plasma, corroborando com os resultados encontrados no presente estudo. Os resultados obtidos no presente estudo estão associados ao tamanho e dose escolhidos de GNPs, os quais foram baseados no protocolo de segurança para uso, minimizando efeitos deletérios. Esse protocolo foi proposto por Muller et al. (2017), definiu que a administração de GNPs (20 nm a 2,5 mg/L) a cada 48 horas durante 21 dias é segura e eficiente para ser utilizada em doenças que apresentem inflamação e estresse oxidativo. Em relação à dose, estudo realizado por Dos Santos Haupenthal et al. (2020), demonstrou que

administrações diárias de GNP intraperitoneal em dose de 2,5 mg/kg em ratos desafiados com LPS não alteram níveis plasmáticos de marcadores de danos, toxicidade hepática e sanguínea, sendo esta dose segura para administração *in vivo*. Outro achado foi que as GNPs não adicionaram danos ao DNA, pois não houve aumento dos índices e frequências de danos nos grupos expostos à fumaça de cigarro e tratados com GNPs, quando comparados ao grupo FC.

Além de exercer efeitos genotóxicos, a exposição à fumaça de cigarro possui propriedades pró-inflamatórias já bem documentadas, capaz de induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α , IL1 β e IL8 (Carnevali et al. 2003; Barnes 2019). Neste estudo foi observado aumento significativo nos níveis de TNF- α no grupo FC.

A resposta inflamatória gerada pelas células epiteliais do trato respiratório por razão do tabagismo gera a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias potentes, junto ao recrutamento de macrófagos e neutrófilos. Há um aumento do número de vesículas de Golgi, retículo endoplasmático e também no tamanho da célula, que é atribuída ao acúmulo de lipídios intracelular devido a oxidação do surfactante em contato com a fumaça do cigarro, levando a um aumento de IL1 β . Essa resposta é alcançada com a alteração de várias vias de sinalização principalmente a proteína quinase ativada por mitogênio (MAPK) e NF κ B, que vai regular intrinsecamente a polarização de macrófagos pulmonares (Arora et al. 2018; Strzelak et al. 2018).

A exposição à fumaça do cigarro, além de aumentar a proliferação de macrófagos nas vias aéreas, altera também sua morfologia e fenótipo. O fenótipo M1 pró-inflamatório é predominante e desempenha um importante papel no início e progressão de condições inflamatórias no pulmão (Wang et al. 2020). O TNF- α oriundo de macrófagos M1 monta a resposta inflamatória ao recrutar neutrófilos para o espaço alveolar, contribuindo para o início de lesões pulmonares agudas. Este marcador celular é responsável pelo aumento da degradação da matriz através de elastase neutrofílica, sendo crucial para a resposta inflamatória. Além disso, pelo seu papel importante na manutenção do estado inflamatório, o tratamento com inibidores do TNF- α é essencial (Churg et al. 2004; Accortt et al. 2017).

A ação anti-inflamatória das GNPs já vem sendo demonstrada por vários estudos (Gao, Wang, Wang, et al. 2019; Gao, Wang, Xiong, et al. 2019;

Haupenthal et al. 2020). No presente estudo, observamos redução nos níveis de TNF- α nos grupos tratados com GNPs nas três distintas doses, sugerindo uma ação anti-inflamatória dessa terapêutica. Sumbayev et al. (2013) sugerem que a ação anti-inflamatória das GNPs está associada à sua capacidade de interação física com a IL1 β extracelular, dessa forma neutraliza a ligação com seu receptor de membrana e inibi sua cascata de sinalização, desta forma impedindo a amplificação da resposta inflamatória. As GNPs também agem bloqueando a ativação do NF- κ B ao interagir com o componente cys-179 resíduo de IKK- β reduzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (Lai et al. 2016; Jeong et al. 2016; Gul et al. 2018). Ratificando essas informações e corroborando aos resultados obtidos no presente estudo, em um modelo animal de inflamação pulmonar aguda por exposição ao LPS, Dos Santos Haupenthal et al. (2020), obtiveram inibição da inflamação aguda pulmonar com redução nos níveis de TNF- α e IL1 β no tecido pulmonar a partir do uso de GNPs estabilizadas com citrato administradas via intraperitoneal, indicando que a terapia com GNPs pode ser promissora em condições de inflamação aguda.

Além de induzir inflamação pulmonar, a fumaça do cigarro leva a aumento de EROs, que são geradas exogenamente pela exposição a produtos químicos/tóxicos, ou endogenamente em processos fisiológicos, como na inflamação. São subprodutos inerentes aos leucócitos ativados, e contribuem para uma resposta inflamatória e destruição do parênquima pulmonar (Fischer, Voynow, and Ghio 2015; Dos Santos Haupenthal et al. 2020). A peroxidacão lipídica é indicativa de aumento de radicais livres, pois os fosfolipídios das membranas celulares são os principais alvos dos danos oxidativos, produzindo uma perda progressiva da integridade e homeostase celular (Hassanen et al. 2020). Além disso, o aumento direto na carga oxidativa produzida pela liberação de radicais de neutrófilos e macrófagos inflamatórios contribui para o estabelecimento de um quadro oxidativo. A interação da fumaça do cigarro com o líquido epitelial de revestimento permite maior formação de EROs, pois elas contêm íons metálicos, como o ferro, que catalisam a produção de radicais livres (Lanzetti et al. 2012; Strzelak et al. 2018) . No presente estudo, os resultados de DCF representam aumento significativo de EROs no grupo FC.

Os grupos tratados com diferentes doses de GNPs diminuíram significativamente a quantidade desses oxidantes quando comparados ao grupo

exposto à fumaça do cigarro, o tratamento com GNPs exibe atividade anti-inflamatória e antioxidante no tecido pulmonar, essa capacidade de reduzir as EROs mediadas por estresse oxidativo se dá pela ação antioxidante, que inibi a formação de EROs e age como sequestrador de radicais livres (scavenger), assim inibi a peroxidação lipídica e traz equilíbrio ao estado redox (Barathmanikanth et al. 2010; Sul et al. 2010; Thakor et al. 2011; Haupenthal et al. 2020). No presente estudo, a dose de GNP à 22,5 mg/L aparentemente se revelou menos efetiva na redução de EROs, na média de células inflamatórias e no diâmetro alveolar nos cortes histológicos. As GNPs em maiores concentrações, tendem a aumentar as oxidações fosfolipídicas teciduais, principalmente após exposição contínua e prolongada, aumentando as quantidades de EROs produzidas no tecido e consequentemente maior dano tecidual (Thakor et al. 2011).

O oxido nítrico (NO) desempenha um papel importante na fisiologia, patologia e resposta inflamatória, porém em níveis altos leva a uma variedade de doenças e lesões nos tecidos. Os ânions superóxido (O_2^-) se combinam rapidamente com o NO derivado de macrófagos para formar peroxinitritos altamente reativos, afetando funções enzimáticas (Lanzetti et al. 2012; Barnes 2020; Dos Santos Haupenthal et al. 2020). Sob condições pró-inflamatórias e de estresse oxidativo, a produção de nitrito é fortemente ativada, além de reagir com superóxido formando peroxinitrito (ONOO $^-$), este oxidante leva a depleção do grupo tiol, alterando o estado redox das células, favorecendo o desenvolvimento de enfisema no tecido pulmonar (Lanzetti et al. 2012; Zhang et al. 2016). No presente estudo todas as doses de GNPs foram capazes de reduzir significativamente os níveis de nitrito, com a dose de 7,5 mg/L de GNP sensivelmente mais eficiente.

Estudos mostram que as GNPs inibem a formação de NO por supressão da ativação de NF- κ B e STAT1, diminuindo a fosforilação de Akt e a degradação de I κ B- α que são responsáveis pela ativação do NF- κ B (Ma et al. 2010; Akgul et al. 2019). Outro mecanismo de ação das GNPs deve-se a ação de sequestro (scavenger) pela área de superfície carregada da GNP que interage com os elétrons não pareados dos radicais livres (Barathmanikanth et al. 2010).

Evidências sugerem que a exposição à fumaça de cigarro aumenta os níveis de EROs, e com isso, interfere na capacidade de reparo e induz dano

oxidativo ao DNA, e desempenha um papel importante na indução de danos ao tecido pulmonar (Dalrymple et al. 2015; Chen et al. 2015). As células epiteliais das vias aéreas são diretamente expostas à fumaça do cigarro e, portanto, alvo de danos induzidos por ela (Zhang et al. 2016).

Normalmente existem mecanismos moleculares inatos eficientes para reparo do DNA, esses mecanismos de reparo são ativados no intervalo de 1 hora após a exposição à fumaça de cigarro, porém insuficientes frente a agressão persistente da exposição a fumaça (Chen et al. 2015).

No pulmão com DPOC os mecanismos moleculares reparadores estão reduzidos, indicando uma falha nesse processo de reparação do DNA, explicando em partes o aumento da frequência de câncer associada ao DPOC (Barnes 2020). Corroborando com o presente estudo, onde repetidas sessões de exposição à fumaça de cigarro representaram maiores índices e frequência de danos ao DNA de células pulmonares.

O Nrf2 é responsável pela principal regulação antioxidante com enzimas desintoxicantes, incluindo glutatona e heme oxigenase, que tem papel protetor no pulmão, nos pacientes com DPOC parece haver uma falha, pois apresentam redução do fator de transcrição Nrf2 quando comparados a células de indivíduos normais (Lai et al. 2015; Barnes 2020). A capacidade das GNPs em reparar danos ao DNA é atribuída à capacidade antioxidante, onde a redução de EROs leva a uma menor instabilidade cromossômica e menos mutações celulares (Chen et al. 2015). Além da alta atividade catalítica de reações de eliminação de radicais livres, as GNPs vêm demonstrando serem capazes de aumentar os níveis de Nrf2, induzindo a sinalização de genes antioxidantes. Este aumento é causado por ação das GNPs, que afetam as ligações tióis de Keap1, e assim, mudam sua conformação, liberando NRF2 para posterior transcrição de genes citoprotetores, desta forma, contribuindo como um agente antioxidante (Cheng et al. 2015; Rattanata et al. 2015; Wang et al. 2017). No presente estudo quando tratados, apenas o grupo com a dose de 7,5 mg/L de GNP foi capaz de reduzir significativamente o índice de danos ao DNA. Enquanto a dose mais baixa, de 2,5 mg/L e a mais alta 22,5 mg/L de GNP não conseguiram reduzir significativamente o índice e frequência de danos ao DNA.

Analisados em conjunto, os resultados mostram uma relação entre a queda dos níveis de EROs, reduções da média de células inflamatórias e

redução do diâmetro alveolar, principalmente nos grupos FC + GNP 7,5 mg/L, o qual também demonstrou uma redução significativa nos níveis de EROs, em consequência também reduziu os danos ao DNA quando comparada as outras doses estudadas.

6 CONCLUSÃO

Os resultados demonstram que a exposição à fumaça de cigarro causa aumento de citocinas inflamatórias, alterações histológicas, danos oxidativos e nitrosivos no pulmão, assim como aumento dos danos ao DNA de células do fígado, plasma sanguíneo e pulmão. A terapia com GNPs reduzidas com citrato e de tamanho médio de 20 nm pode ser promissora no tratamento dessas injúrias pulmonares causadas pela fumaça do cigarro sem causar maiores efeitos genotóxicos do que aqueles causados pela própria fumaça de cigarro.

As três doses de GNPs (2,5, 7,5 e 22,5 mg/L) utilizadas no presente estudo tiveram efeitos anti-inflamatórios diretamente proporcionais à dose no tecido pulmonar. No entanto, a dose de 7,5 mg/L de GNP mostrou uma melhor resposta ao reduzir danos oxidativos, reverter o diâmetro alveolar médio e a média de células inflamatórias na histologia, assim como, reduzir significativamente o índice de danos ao DNA em células pulmonares e não acrescentar maior genotoxicidade sistêmica do que aquela já causada pela fumaça do cigarro.

Contudo, mais estudos precisam ser realizados com intuito de elucidar os mecanismos de atuação das GNPs frente as agressões inflamatórias e oxidantes no tecido pulmonar e assim criar terapias eficazes

REFERENCIAS

- Accortt, N. A., J. B. Chung, M. Bonafede, B. L. Limone, and D. M. Mannino. 2017. 'Retrospective analysis to describe associations between tumor necrosis factor alpha inhibitors and COPD-related hospitalizations', *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 12: 2085-94.
- Akgul, A. G., D. Sahin, U. Temel, A. Elicora, M. Dillioglugil, H. Maral Kir, O. D. Ozsoy, K. Yildiz, C. Ozer, and S. Topcu. 2019. 'Effect of nitric oxide synthase inhibitors in acute lung injury due to blunt lung trauma in rats', *Turk Gogus Kalp Damar Cerrahisi Derg*, 27: 63-72.
- Alsaad, A. M., M. N. Al-Arifi, Z. H. Maayah, I. M. Attafi, F. E. Alanazi, O. M. Belali, A. Alhoshani, Y. A. Asiri, and H. M. Korashy. 2019. 'Genotoxic impact of long-term cigarette and waterpipe smoking on DNA damage and oxidative stress in healthy subjects', *Toxicol Mech Methods*, 29: 119-27.
- Andrault, P. M., A. C. Schamberger, T. Chazeirat, D. Sizaret, J. Renault, C. A. Staab-Weijnitz, E. Hennen, A. Petit-Courty, M. Wartenberg, A. Saidi, T. Baranek, S. Guyetant, Y. Courty, O. Eickelberg, G. Lalmanach, and F. Lecaille. 2019. 'Cigarette smoke induces overexpression of active human cathepsin S in lungs from current smokers with or without COPD', *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 317: L625-I38.
- Arora, S., K. Dev, B. Agarwal, P. Das, and M. A. Syed. 2018. 'Macrophages: Their role, activation and polarization in pulmonary diseases', *Immunobiology*, 223: 383-96.
- Balasubramanian, S. K., J. Jittiwat, J. Manikandan, C. N. Ong, L. E. Yu, and W. Y. Ong. 2010. 'Biodistribution of gold nanoparticles and gene expression changes in the liver and spleen after intravenous administration in rats', *Biomaterials*, 31: 2034-42.
- Balkissoon, R. 2019. 'Journal Club-COPD2020 Update. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease 2020 Report and the Journal of the COPD Foundation Special Edition, Moving to a New Definition for COPD: "COPDGene(®) 2019"', *Chronic Obstr Pulm Dis*, 6: 64-72.
- Barathmanikanth, S., K. Kalishwaralal, M. Sriram, S. R. Pandian, H. S. Youn, S. Eom, and S. Gurunathan. 2010. 'Anti-oxidant effect of gold nanoparticles restrains hyperglycemic conditions in diabetic mice', *J Nanobiotechnology*, 8: 16.
- Barnes, P. J. 2008. 'The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease', *J Clin Invest*, 118: 3546-56.
- . 2014. 'Cellular and molecular mechanisms of chronic obstructive pulmonary disease', *Clin Chest Med*, 35: 71-86.
- . 2017. 'Cellular and molecular mechanisms of asthma and COPD', *Clin Sci (Lond)*, 131: 1541-58.

———. 2019. 'Small airway fibrosis in COPD', *Int J Biochem Cell Biol*, 116: 105598.

———. 2020. 'Oxidative stress-based therapeutics in COPD', *Redox Biol*: 101544.

Barnes, P. J., S. D. Shapiro, and R. A. Pauwels. 2003. 'Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms', *European Respiratory Journal*, 22: 672.

Bhattacharya, R., and P. Mukherjee. 2008. 'Biological properties of "naked" metal nanoparticles', *Adv Drug Deliv Rev*, 60: 1289-306.

Carnevali, S., S. Petruzzelli, B. Longoni, R. Vanacore, R. Barale, M. Cipollini, F. Scatena, P. Paggiaro, A. Celi, and C. Giuntini. 2003. 'Cigarette smoke extract induces oxidative stress and apoptosis in human lung fibroblasts', *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 284: L955-63.

Chae, S. Y., M. Lee, S. W. Kim, and Y. H. Bae. 2004. 'Protection of insulin secreting cells from nitric oxide induced cellular damage by crosslinked hemoglobin', *Biomaterials*, 25: 843-50.

Chen, Z., D. Wang, X. Liu, W. Pei, J. Li, Y. Cao, J. Zhang, Y. An, J. Nie, and J. Tong. 2015. 'Oxidative DNA damage is involved in cigarette smoke-induced lung injury in rats', *Environ Health Prev Med*, 20: 318-24.

Cheng, H., G. Lai, L. Fu, H. Zhang, and A. Yu. 2015. 'Enzymatically catalytic deposition of gold nanoparticles by glucose oxidase-functionalized gold nanoprobe for ultrasensitive electrochemical immunoassay', *Biosens Bioelectron*, 71: 353-58.

Churg, A., R. D. Wang, H. Tai, X. Wang, C. Xie, and J. L. Wright. 2004. 'Tumor necrosis factor- α drives 70% of cigarette smoke-induced emphysema in the mouse', *Am J Respir Crit Care Med*, 170: 492-8.

Collins, Andrew, Mária Dušinská, Michael Franklin, Martina Somorovská, Helena Petrovská, Susan Duthie, Laurence Fillion, Mihalis Panayiotidis, Katarína Rašlová, and Nicholas Vaughan. 1997. 'Comet assay in human biomonitoring studies: Reliability, validation, and applications', 30: 139-46.

Dalrymple, A., P. Ordonez, D. Thorne, D. Dillon, and C. Meredith. 2015. 'An improved method for the isolation of rat alveolar type II lung cells: Use in the Comet assay to determine DNA damage induced by cigarette smoke', *Regul Toxicol Pharmacol*, 72: 141-9.

De Araújo, R. F., Jr., J. B. Pessoa, L. J. Cruz, A. B. Chan, E. De Castro Miguel, R. S. Cavalcante, G. A. C. Brito, H. F. O. Silva, L. H. S. Gasparotto, P. M. M. Guedes, and A. A. Araújo. 2018. 'Apoptosis in human liver carcinoma caused by gold nanoparticles in combination with carvedilol is mediated via modulation of MAPK/Akt/mTOR pathway and EGFR/FAAD proteins', *Int J Oncol*, 52: 189-200.

De Jong, W. H., W. I. Hagens, P. Krystek, M. C. Burger, A. J. Sips, and R. E. Geertsma. 2008. 'Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration', *Biomaterials*, 29: 1912-9.

DeMarini, D. M. 2004. 'Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate: a review', *Mutat Res*, 567: 447-74.

Dong, J., K. K. Sulik, and S. Y. Chen. 2010. 'The role of NOX enzymes in ethanol-induced oxidative stress and apoptosis in mouse embryos', *Toxicol Lett*, 193: 94-100.

Dos Santos Haupenthal, D. P., C. Mendes, G. de Bem Silveira, R. P. Zaccaron, Meab Correa, R. T. Nesi, R. A. Pinho, M. M. da Silva Paula, and P. C. L. Silveira. 2020. 'Effects of treatment with gold nanoparticles in a model of acute pulmonary inflammation induced by lipopolysaccharide', *J Biomed Mater Res A*, 108: 103-15.

dos Santos Tramontin, Natalia, Sabrina da Silva, Rychard Arruda, Kellen Simon Ugioni, Paula Bortuluzzi Canteiro, Gustavo de Bem Silveira, Carolini Mendes, Paulo Cesar Lock Silveira, and Alexandre Pastoris Muller. 2020. 'Gold Nanoparticles Treatment Reverses Brain Damage in Alzheimer's Disease Model', *Molecular Neurobiology*, 57: 926-36.

Downs, T. R., M. E. Crosby, T. Hu, S. Kumar, A. Sullivan, K. Sarlo, B. Reeder, M. Lynch, M. Wagner, T. Mills, and S. Pfuhler. 2012. 'Silica nanoparticles administered at the maximum tolerated dose induce genotoxic effects through an inflammatory reaction while gold nanoparticles do not', *Mutat Res*, 745: 38-50.

Elbakary, R. H., E. F. Okasha, A. M. Hassan Ragab, and M. H. Ragab. 2018. 'Histological Effects of Gold Nanoparticles on the Lung Tissue of Adult Male Albino Rats', *J Microsc Ultrastruct*, 6: 116-22.

Fischer, B. M., J. A. Voynow, and A. J. Ghio. 2015. 'COPD: balancing oxidants and antioxidants', *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 10: 261-76.

Gao, W., L. Wang, K. Wang, L. Sun, Y. Rao, A. Ma, M. Zhang, Q. Li, and H. Yang. 2019. 'Enhanced Anti-inflammatory Activity of Peptide-Gold Nanoparticle Hybrids upon Cigarette Smoke Extract Modification through TLR Inhibition and Autophagy Induction', *ACS Appl Mater Interfaces*, 11: 32706-19.

Gao, W., Y. Wang, Y. Xiong, L. Sun, L. Wang, K. Wang, H. Y. Lu, A. Bao, S. E. Turvey, Q. Li, and H. Yang. 2019. 'Size-dependent anti-inflammatory activity of a peptide-gold nanoparticle hybrid in vitro and in a mouse model of acute lung injury', *Acta Biomater*, 85: 203-17.

Ghosh, P., G. Han, M. De, C. K. Kim, and V. M. Rotello. 2008. 'Gold nanoparticles in delivery applications', *Adv Drug Deliv Rev*, 60: 1307-15.

Gul, A., B. Kunwar, M. Mazhar, S. Faizi, D. Ahmed, M. R. Shah, and S. U. Simjee. 2018. 'Rutin and rutin-conjugated gold nanoparticles ameliorate collagen-induced

arthritis in rats through inhibition of NF-kappaB and iNOS activation', *Int Immunopharmacol*, 59: 310-17.

Halliwell, B. 2006. 'Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life', *Plant Physiol*, 141: 312-22.

Hartl, D., R. Tirouvanziam, J. Laval, C. M. Greene, D. Habel, L. Sharma, AÖ Yildirim, C. S. Dela Cruz, and C. M. Hogaboam. 2018. 'Innate Immunity of the Lung: From Basic Mechanisms to Translational Medicine', *J Innate Immun*, 10: 487-501.

Hassanen, E. I., E. A. Morsy, A. M. Hussien, M. A. Ibrahim, and K. Y. Farroh. 2020. 'The effect of different concentrations of gold nanoparticles on growth performance, toxicopathological and immunological parameters of broiler chickens', *Biosci Rep*, 40.

Hauptenthal, Dpds, J. C. Possato, R. P. Zaccaron, C. Mendes, M. S. Rodrigues, R. T. Nesi, R. A. Pinho, P. E. Feuser, R. A. Machado-de-Avila, C. M. Comim, and P. C. L. Silveira. 2020. 'Effects of chronic treatment with gold nanoparticles on inflammatory responses and oxidative stress in Mdx mice', *J Drug Target*, 28: 46-54.

Jeong, J., J. Kim, S. H. Seok, and W. S. Cho. 2016. 'Indium oxide (In₂O₃) nanoparticles induce progressive lung injury distinct from lung injuries by copper oxide (CuO) and nickel oxide (NiO) nanoparticles', *Arch Toxicol*, 90: 817-28.

Jiang, Y., X. Wang, and D. Hu. 2017. 'Mitochondrial alterations during oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease', *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 12: 1153-62.

Karthick, V., V. G. Kumar, T. S. Dhas, G. Singaravelu, A. M. Sadiq, and K. Govindaraju. 2014. 'Effect of biologically synthesized gold nanoparticles on alloxan-induced diabetic rats-an in vivo approach', *Colloids Surf B Biointerfaces*, 122: 505-11.

Kennedy-Feitosa, E., R. T. Okuro, V. Pinho Ribeiro, M. Lanzetti, M. V. Barroso, W. A. Zin, L. C. Porto, L. Brito-Gitirana, and S. S. Valenca. 2016. 'Eucalyptol attenuates cigarette smoke-induced acute lung inflammation and oxidative stress in the mouse', *Pulm Pharmacol Ther*, 41: 11-18.

Kim, H. Y., S. S. Park, and S. T. Lim. 2015. 'Preparation, characterization and utilization of starch nanoparticles', *Colloids Surf B Biointerfaces*, 126: 607-20.

Kliment, C. R., and T. D. Oury. 2010. 'Oxidative stress, extracellular matrix targets, and idiopathic pulmonary fibrosis', *Free Radic Biol Med*, 49: 707-17.

Lai, T. H., C. H. Chung, B. H. Chen, C. F. Hung, B. S. Inbaraj, M. C. Ma, H. M. Chen, C. J. Tsou, P. H. Wu, and W. B. Wu. 2016. 'Gold Nanoparticles Compromise TNF-alpha-Induced Endothelial Cell Adhesion Molecule Expression Through NF-kappaB and Protein Degradation Pathways and Reduce Neointima

Formation in A Rat Carotid Balloon Injury Model', *J Biomed Nanotechnol*, 12: 2185-01.

Lai, T. H., J. M. Shieh, C. J. Tsou, and W. B. Wu. 2015. 'Gold nanoparticles induce heme oxygenase-1 expression through Nrf2 activation and Bach1 export in human vascular endothelial cells', *Int J Nanomedicine*, 10: 5925-39.

Lanzetti, M., C. A. da Costa, R. T. Nesi, M. V. Barroso, V. Martins, T. Victoni, V. Lagente, K. M. Pires, P. M. e Silva, A. C. Resende, L. C. Porto, C. F. Benjamim, and S. S. Valenca. 2012. 'Oxidative stress and nitrosative stress are involved in different stages of proteolytic pulmonary emphysema', *Free Radic Biol Med*, 53: 1993-2001.

Liu, B., W. Cao, J. Cheng, S. Fan, S. Pan, L. Wang, J. Niu, Y. Pan, Y. Liu, X. Sun, L. Ma, J. Song, J. Ni, and D. Cui. 2019. 'Human natural killer cells for targeting delivery of gold nanostars and bimodal imaging directed photothermal/photodynamic therapy and immunotherapy', *Cancer Biol Med*, 16: 756-70.

Lopez-Chaves, C., J. Soto-Alvaredo, M. Montes-Bayon, J. Bettmer, J. Llopis, and C. Sanchez-Gonzalez. 2018. 'Gold nanoparticles: Distribution, bioaccumulation and toxicity. In vitro and in vivo studies', *Nanomedicine*, 14: 1-12.

Ma, J. S., W. J. Kim, J. J. Kim, T. J. Kim, S. K. Ye, M. D. Song, H. Kang, D. W. Kim, W. K. Moon, and K. H. Lee. 2010. 'Gold nanoparticles attenuate LPS-induced NO production through the inhibition of NF-kappaB and IFN-beta/STAT1 pathways in RAW264.7 cells', *Nitric Oxide*, 23: 214-9.

Muller, A. P., G. K. Ferreira, S. da Silva, R. T. Nesi, G. de Bem Silveira, C. Mendes, R. A. Pinho, M. M. da Silva Paula, and P. C. L. Silveira. 2017. 'Safety protocol for the gold nanoparticles administration in rats', *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 77: 1145-50.

Ortiz-Benitez, E. A., N. Velazquez-Guadarrama, N. V. Duran Figueroa, H. Quezada, and J. J. Olivares-Trejo. 2019. 'Antibacterial mechanism of gold nanoparticles on *Streptococcus pneumoniae*', *Metallomics*, 11: 1265-76.

Pan, Y., A. Leifert, D. Ruau, S. Neuss, J. Bornemann, G. Schmid, W. Brandau, U. Simon, and W. Jahnen-Dechent. 2009. 'Gold nanoparticles of diameter 1.4 nm trigger necrosis by oxidative stress and mitochondrial damage', *Small*, 5: 2067-76.

Paula, M. M., F. Petronilho, F. Vuolo, G. K. Ferreira, L. De Costa, G. P. Santos, P. S. Eftting, F. Dal-Pizzol, A. G. Dal-Bó, T. E. Frizon, P. C. Silveira, and R. A. Pinho. 2015. 'Gold nanoparticles and/or N-acetylcysteine mediate carrageenan-induced inflammation and oxidative stress in a concentration-dependent manner', *J Biomed Mater Res A*, 103: 3323-30.

Pedroso-Fidelis, G. D. S., H. R. Farias, G. A. Mastella, L. A. Bouffleur-Niekraszewicz, J. F. Dias, M. C. Alves, P. C. L. Silveira, R. T. Nesi, F. Carvalho,

J. J. Zocche, and R. A. Pinho. 2020. 'Pulmonary oxidative stress in wild bats exposed to coal dust: A model to evaluate the impact of coal mining on health', *Ecotoxicol Environ Saf*, 191: 110211.

Poetsch, A. R. 2020. 'The genomics of oxidative DNA damage, repair, and resulting mutagenesis', *Comput Struct Biotechnol J*, 18: 207-19.

Pouwels, S. D., G. J. Zijlstra, M. van der Toorn, L. Hesse, R. Gras, N. H. Ten Hacken, D. V. Krysko, P. Vandenabeele, M. de Vries, A. J. van Oosterhout, I. H. Heijink, and M. C. Nawijn. 2016. 'Cigarette smoke-induced necroptosis and DAMP release trigger neutrophilic airway inflammation in mice', *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 310: L377-86.

Rahman, I., and V. L. Kinnula. 2012. 'Strategies to decrease ongoing oxidant burden in chronic obstructive pulmonary disease', *Expert Rev Clin Pharmacol*, 5: 293-309.

Rattanata, N., S. Daduang, M. Wongwattanakul, C. Leelayuwat, T. Limpai boon, R. Lekphrom, A. Sandee, P. Boonsiri, S. Chio-Srichan, and J. Daduang. 2015. 'Gold Nanoparticles Enhance the Anticancer Activity of Gallic Acid against Cholangiocarcinoma Cell Lines', *Asian Pac J Cancer Prev*, 16: 7143-7.

Rubenfeld, G. D. 2003. 'Epidemiology of acute lung injury', *Crit Care Med*, 31: S276-84.

Russo, P., P. Lamonaca, M. Milic, E. Rojas, G. Prinzi, V. Cardaci, L. Vitiello, S. Proietti, A. Santoro, C. Tomino, M. Fini, and S. Bonassi. 2019. 'Biomarkers of DNA damage in COPD patients undergoing pulmonary rehabilitation: Integrating clinical parameters with genomic profiling', *Mutat Res*, 843: 111-17.

Shukla, R., V. Bansal, M. Chaudhary, A. Basu, R. R. Bhonde, and M. Sastry. 2005. 'Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: a microscopic overview', *Langmuir*, 21: 10644-54.

Silveira, P. C., M. Venancio, P. S. Souza, E. G. Victor, F. de Souza Notoya, C. S. Paganini, E. L. Streck, L. da Silva, R. A. Pinho, and M. M. Paula. 2014. 'Iontophoresis with gold nanoparticles improves mitochondrial activity and oxidative stress markers of burn wounds', *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 44: 380-5.

Silveira, P. C., M. Venâncio, P. S. Souza, E. G. Victor, F. de Souza Notoya, C. S. Paganini, E. L. Streck, L. da Silva, R. A. Pinho, and M. M. Paula. 2014. 'Iontophoresis with gold nanoparticles improves mitochondrial activity and oxidative stress markers of burn wounds', *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 44: 380-5.

Strzelak, A., A. Ratajczak, A. Adamiec, and W. Feleszko. 2018. 'Tobacco Smoke Induces and Alters Immune Responses in the Lung Triggering Inflammation, Allergy, Asthma and Other Lung Diseases: A Mechanistic Review', *Int J Environ Res Public Health*, 15.

Sul, O. J., J. C. Kim, T. W. Kyung, H. J. Kim, Y. Y. Kim, S. H. Kim, J. S. Kim, and H. S. Choi. 2010. 'Gold nanoparticles inhibited the receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL)-induced osteoclast formation by acting as an antioxidant', *Biosci Biotechnol Biochem*, 74: 2209-13.

Sumbayev, V. V., I. M. Yasinska, C. P. Garcia, D. Gilliland, G. S. Lall, B. F. Gibbs, D. R. Bonsall, L. Varani, F. Rossi, and L. Calzolari. 2013. 'Gold nanoparticles downregulate interleukin-1beta-induced pro-inflammatory responses', *Small*, 9: 472-7.

Thakor, A. S., R. Paulmurugan, P. Kempen, C. Zavaleta, R. Sinclair, T. F. Massoud, and S. S. Gambhir. 2011. 'Oxidative stress mediates the effects of Raman-active gold nanoparticles in human cells', *Small*, 7: 126-36.

Tice, Raymond, E. Agurell, Diana Anderson, Brian Burlinson, Andreas Hartmann, H. Kobayashi, Y. Miyamae, Emilio Rojas, J. Ryu, and Yu Sasaki. 2000. 'Single cell gel/Comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing', *Environmental and molecular mutagenesis*, 35: 206-21.

Tsai, C. Y., A. L. Shiau, S. Y. Chen, Y. H. Chen, P. C. Cheng, M. Y. Chang, D. H. Chen, C. H. Chou, C. R. Wang, and C. L. Wu. 2007. 'Amelioration of collagen-induced arthritis in rats by nanogold', *Arthritis Rheum*, 56: 544-54.

Turkevich, John, Peter Cooper Stevenson, and James Hillier. 1951. "A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold." In. Urso, M. L., and P. M. Clarkson. 2003. 'Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation', *Toxicology*, 189: 41-54.

Victor, E. G., P. C. Silveira, J. C. Possato, G. L. da Rosa, U. B. Munari, C. T. de Souza, R. A. Pinho, L. da Silva, E. L. Streck, and M. M. Paula. 2012. 'Pulsed ultrasound associated with gold nanoparticle gel reduces oxidative stress parameters and expression of pro-inflammatory molecules in an animal model of muscle injury', *J Nanobiotechnology*, 10: 11.

Wang, L., H. Zhang, L. Sun, W. Gao, Y. Xiong, A. Ma, X. Liu, L. Shen, Q. Li, and H. Yang. 2020. 'Manipulation of macrophage polarization by peptide-coated gold nanoparticles and its protective effects on acute lung injury', *J Nanobiotechnology*, 18: 38.

Wang, X., R. Xu, X. Sun, Y. Wang, X. Ren, B. Du, D. Wu, and Q. Wei. 2017. 'Using reduced graphene oxide-Ca: CdSe nanocomposite to enhance photoelectrochemical activity of gold nanoparticles functionalized tungsten oxide for highly sensitive prostate specific antigen detection', *Biosens Bioelectron*, 96: 239-45.

Wright, J. L., and A. Churg. 2007. 'Current concepts in mechanisms of emphysema', *Toxicol Pathol*, 35: 111-5.

Xiong, Y., W. Gao, F. Xia, Y. Sun, L. Sun, L. Wang, S. Ben, S. E. Turvey, H. Yang, and Q. Li. 2018. 'Peptide-Gold Nanoparticle Hybrids as Promising Anti-

Inflammatory Nanotherapeutics for Acute Lung Injury: In Vivo Efficacy, Biodistribution, and Clearance', *Adv Healthc Mater*, 7: e1800510.

Yan, X. Q., J. H. Chen, Q. F. Jiang, W. Liu, N. Xi, and Z. S. Wu. 2005. '[Preparation and surface modification of the magnetic fluid as a targeted drug carrier]', *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, 25: 626-9.

Zelová, H., and J. Hošek. 2013. 'TNF- α signalling and inflammation: interactions between old acquaintances', *Inflamm Res*, 62: 641-51.

Zhang, H. X., S. J. Liu, X. L. Tang, G. L. Duan, X. Ni, X. Y. Zhu, Y. J. Liu, and C. N. Wang. 2016. 'H₂S Attenuates LPS-Induced Acute Lung Injury by Reducing Oxidative/Nitrative Stress and Inflammation', *Cell Physiol Biochem*, 40: 1603-12.

Zhang, Xuemei, Keji Song, Huanzhang Xiong, Hongyu Li, Xiao Chu, and Xuming Deng. 2009. 'Protective effect of florfenicol on acute lung injury induced by lipopolysaccharide in mice', *Int Immunopharmacol*, 9: 1525-29.

Zheng, T., J. Crews, J. L. McGill, K. Dhume, C. Finn, T. Strutt, K. K. McKinstry, and Q. Huo. 2019. 'A Single-Step Gold Nanoparticle-Blood Serum Interaction Assay Reveals Humoral Immunity Development and Immune Status of Animals from Neonates to Adults', *ACS Infect Dis*, 5: 228-38.

Zhou-Suckow, Z., J. Duerr, M. Hagner, R. Agrawal, and M. A. Mall. 2017. 'Airway mucus, inflammation and remodeling: emerging links in the pathogenesis of chronic lung diseases', *Cell Tissue Res*, 367: 537-50.