

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

**ÉRIA CARDOSO**

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE  
OURO SOBRE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS EM CÉREBRO  
DE RATOS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde para obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr. Marcos Marques da Silva Paula.

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vanessa Moraes de Andrade

**CRICIÚMA  
2014**

## Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

C268e Cardoso, Éria.

Efeitos da administração de nanopartículas de ouro sobre parâmetros bioquímicos em cérebro de ratos / Éria Cardoso; orientador: Marcos Marques da Silva Paula, co-orientadora: Vanessa Moraes de Andrade. – Criciúma, SC : Ed. do Autor, 2014.

110 p : il. ; 21 cm.

Tese (Doutorado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, SC, 2014.

1. Nanopartículas de ouro. 2. Metabolismo energético. 3. Dano ao DNA. 4. Estresse oxidativo. 5. Genotoxicidade. I. Título.

CDD. 22ª ed.

615.1



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC

Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão

Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)

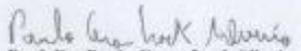
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de 03.06.2005

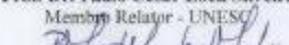
## PARECER

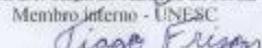
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Tese de DOUTORADO apresentada pela candidata **Éria Cardoso** sob o título **“Efeitos da administração de nanopartículas de ouro sobre parâmetros bioquímicos em cérebro de ratos”** para obtenção do grau de **DOUTORA EM CIÊNCIAS DA SAÚDE** do Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

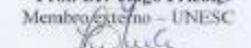
Após haver analisado o referido trabalho e arguido a candidata, os membros são de parecer pela **“APROVAÇÃO”** da Tese, com conceito **A**.

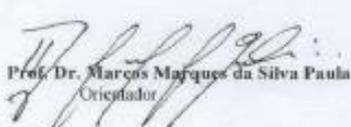
Criciúma, SC, 30 de maio de 2014.

  
**Prof. Dr. Paulo Cesar Lock Silveira**  
Membro Relator - UNESC

  
**Prof. Dr. Ricardo André de Avila**  
Membro interno - UNESC

  
**Prof. Dr. Diego Frizon**  
Membro externo - UNESC

  
**Profa. Dra. Jucelia Fortunato**  
Membro externo - UNISUL

  
**Prof. Dr. Marcos Marques da Silva Paula**  
Orientador

  
**Prof. Dr. Claudio Teodoro de Souza**  
Coordenador do PPGCS



## FOLHA INFORMATIVA

Esta tese foi elaborada segundo o estilo Vancouver e será apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Síntese e Complexos Multifuncionais em colaboração com o Laboratório de caracterização de materiais do Instituto de Engenharia e Tecnologia do Parque Científico e Tecnológico, Laboratórios de Biologia Celular e Molecular, Laboratório de Fisiopatologia Experimental e laboratório de Bioenergética, do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense e contou com a cooperação dos alunos bolsistas, Elton Torres Zanoni, João Vitor Vieira Ronconi, Frederico de Souza Notoya, Cinara L. Gonçalves, Gabriela K. Ferreira, Daniela Dimer Leffa, Adriani Paganini Damiani, Francine Daumann, Francieli Silva Vuolo, Letícia Selinger Galant, Monique Michels e, em parceria com as professoras Fabricia Petronilho e Gislane Tezza Rezin do Laboratório de Fisiopatologia Clínica e Experimental da Universidade do Sul de Santa Catarina sob a coordenação do professor Marcos Marques da Silva Paula e Co- Orientação da professora Vanessa Moraes de Andrade.



Dedico esta tese aos meus dois grandes amores: meu filho Rodrigo Freitas de Souza Júnior e ao meu esposo Rodrigo Freitas de Souza, meus maiores incentivadores e fonte de inspiração e amor. Se não fosse esse amor, nada seria ou valeria. A eles, toda a minha gratidão, respeito e afeto.



## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço ao Grande Arquiteto do Universo que sem Ele, nada disso seria possível. Agradeço-Te por estar sempre comigo, iluminando meus passos, dando-me sabedoria, serenidade e coragem para que eu chegasse até aqui e com muita vontade de seguir adiante. A Você o meu maior e sincero agradecimento.

O desenvolvimento deste trabalho não teria sido possível sem a participação de um grande número de pessoas, a quem eu gostaria de agradecer:

Ao Professor, orientador e amigo Marcos Marques da Silva Paula, pelo acompanhamento, apoio, dedicação, incentivo e principalmente pela oportunidade de trabalhar sob sua orientação, sempre acreditando e oportunizando a realização desta pesquisa, compartilhando comigo seus conhecimentos e contribuindo desta forma para que eu obtivesse as ferramentas que me proporcionaram um enorme amadurecimento profissional e pessoal;

A minha co-orientadora e professora Vanessa Moraes de Andrade, pela oportunidade em participar de outros trabalhos e aumentar o meu conhecimento dentro da ciência.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da UNESC que, de uma forma ou de outra, contribuíram com a realização deste trabalho, especialmente aos professores Emilio L. Streck, Vanessa Moraes de Andrade e Felipe Dal Pizzol.

Agradeço também ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e a Universidade do Extremo Sul Catarinense pelo apoio e companheirismo.

A todos os integrantes dos Laboratórios LASICOM, LABIM, BIONERGETICA e FISIOPAT do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da UNESC, pela parceria na realização dos experimentos.

Aos membros da Comissão Permanente de Pessoal Docente do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Catarinense (Campus Sombrio), pela aprovação do meu afastamento integral para realização desse doutorado.

A Direção Geral do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Catarinense (Campus Sombrio), representado pelo Sr. Carlos Antônio Krause pelo incentivo e apoio dado ao meu aperfeiçoamento enquanto docente, no intuito de promover a melhora na qualidade de ensino dessa Instituição.



Aos alunos bolsistas do LASICOM do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da UNESC, que foram, desde o início, base de motivação e inspiração para o presente trabalho, que muito ajudaram e torceram pelo êxito da minha pesquisa e que se tornaram meus grandes amigos.

A minha grande incentivadora e amiga Gislaine Tezza Rezin, pela incansável contribuição e dedicação, por todo carinho, pelas valiosas discussões durante o desenvolvimento do trabalho e pela grande disponibilidade em ajudar sempre que precisei, me apoiando nas dificuldades, medos e inseguranças. Quero cultivar esta amizade que, ao longo dos anos o tempo amadureceu. Obrigada por ter cruzado o meu caminho.

“Você verá que é mesmo assim, que a história não tem fim, continua sempre que você responde sim”... Obrigada pelo “*sim*” de sempre.

Aos meus amigos que de diferentes maneiras, por atos ou pensamentos foram muito importantes neste processo.

A todos aqueles que confiaram em meu trabalho, da mesma forma o faço aos que me criticaram.

A toda a minha família pelo amor, carinho e dedicação, sempre me apoiando, aconselhando e tranquilizando em dias de incertezas. Almejando junto a mim minhas conquistas. Dividirei sempre, o mérito de todas as minhas conquistas, porque todas elas lhes pertencem também. Dentre todas as palavras que imagino dizer-lhes nesse momento, a mais sensata é OBRIGADA!

Ao meu esposo Rodrigo, pessoa que escolhi para compartilhar a minha vida e que é cúmplice desta conquista, que suportou minhas ausências e compartilhou minhas angústias, colocando sorriso em meu rosto. Obrigada por estar ao meu lado em mais esta etapa de minha vida, transmitindo confiança e carinho nos momentos mais difíceis, incentivando-me a prosseguir fossem quais fossem os obstáculos. Embora em muitos momentos não pudéssemos ficar juntos, sei que o teu amor e estímulo foram os instrumentos desta vitória que puderam tornar tudo isso possível. E, agora posso declarar o meu “muito obrigada” que é tão intenso e sincero quanto o meu amor por você.

Ao meu filho Rodrigo, minha maior e eterna paixão, que veio ao mundo para me ensinar o verdadeiro amor e de como amar alguém incondicionalmente, de como mudar meus piores defeitos para dar os melhores exemplos e de aprender a ter coragem. Você, filho, é o meu cuidado, a minha fé, o meu interesse pela vida, a minha admiração pelas crianças, o meu respeito pelas pessoas, o meu amor por Deus. É o meu



ontem, o meu hoje, o meu amanhã. A minha vontade, a inspiração, a poesia. A lição, o dever. Você é a presença, a surpresa, a esperança. A minha dedicação. A minha oração. A minha gratidão. O meu respeito. A minha coragem. O meu amor mais puro e bonito. Te amo por todas as suas virtudes. Ou...*"Amor por nenhuma outra razão.....a não ser de simplesmente existir"*. Especialmente a você, quero compartilhar minha felicidade. A você, o sonho, o beijo, o abraço, o diploma, a vida, o futuro!

Por fim, a todos vocês, cada um do seu jeito que direta ou indiretamente contribuíram de forma significativa na elaboração e conclusão desta Tese, meu sincero e carinhoso: obrigada!



“Quando vamos ao mundo muito, muito pequeno – digamos, circuitos de sete átomos – acontece uma série de coisas novas que significam oportunidades completamente novas para “design”. Átomos na escala pequena não se comportam como nada na escala grande, pois eles seguem as leis da mecânica quântica. Assim, à medida em que descemos de escala e brincamos com os átomos, estaremos trabalhando com leis diferentes, e poderemos esperar fazer coisas diferentes. Podemos produzir de formas diferentes”.

**Richard P. Feynman**



## RESUMO

Nanotecnologia envolve a manipulação de materiais em escala nanométrica para produzir novas estruturas, dispositivos e materiais, criando uma estrutura atômica ou molecular diferenciada. Nanopartículas de ouro (GNP) tem sido intensamente estudadas devido a sua potencial aplicação como metalofármaco. No entanto, os efeitos induzidos pelas GNP no Sistema Nervoso Central (SNC) permanecem desconhecidos. Neste estudo sintetizamos e caracterizamos GNP com diâmetros médios de 10 e 30 nm (GNP-10 e GNP-30) e avaliamos parâmetros de metabolismo energético, estresse oxidativo e dano ao ácido desoxirribonucléico (DNA) em cérebro de ratos adultos submetidos à administração aguda e crônica de GNP-10 e GNP-30. Ratos Wistar adultos (60 dias de idade) receberam uma simples (administração aguda) ou repetidas injeções intraperitoneal, uma vez ao dia, durante 28 dias (administração crônica) de GNP nos dois tamanhos ou salina. Vinte e quatro horas após a única ou última administração, os animais foram mortos, o cérebro foi removido e o córtex pré-frontal, cerebelo, hipocampo, estriado e córtex posterior foram isolados para avaliação da atividade das enzimas citrato sintase, malato e succinato desidrogenase, creatina quinase, complexo I, II, II-III, IV, superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), também foi avaliado os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), carbonilação de proteínas, frequência de dano (FD) e índice de dano (ID) ao DNA. A administração aguda de GNP-10 causou inibição do metabolismo energético no hipocampo, estriado e córtex posterior. A administração crônica de ambas as dimensões causaram inibição do metabolismo energético somente em córtex posterior. Ainda, houve uma diminuição nos níveis de TBARS e carbonilação de proteínas no cérebro de ratos submetidos à administração aguda. Administração crônica não alterou esses parâmetros. Por outro lado, a alteração na atividade da SOD e CAT foi observada em ambas as administrações. Constatamos também que GNP induz altos níveis de dano ao DNA em córtex posterior de forma diferente dependendo do tipo de administração e do tamanho das nanopartículas, sendo que a administração aguda de GNP-10 apresentou-se menos tóxica que a GNP-30. Entretanto na administração crônica, a genotoxicidade foi a mesma, independentemente do tamanho administrado, a FD e o ID ao DNA não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos. A administração crônica apresentou dano significativamente maior que a administração aguda em ambos os tamanhos. Este estudo mostrou que, a administração aguda e crônica de



GNP causou inibição do metabolismo energético, diminuiu a peroxidação lipídica e a carbonilação de proteínas, alterou a atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT e causou dano ao DNA cerebral de ratos, de forma diferente para cada estrutura avaliada dependendo do tamanho e/ou da administração efetuada.

**Palavras-Chave:** Nanotecnologia. Nanopartículas de ouro. Metabolismo energético. Estresse oxidativo. Dano em DNA.



## ABSTRACT

Nanotechnology involves the manipulation of materials at the nanoscale to produce new structures, materials and devices scale, creating a different atomic or molecular structure. Gold nanoparticles (GNP) has been intensively studied due to their potential application as metalofármaco. However, the effects induced by GNP in the Central Nervous System (CNS) remain unknown. In this study we synthesized and characterized GNP with average diameters of 10 and 30 nm (GNP-10 and GNP-30) and evaluated parameters of energy metabolism, oxidative stress and damage to deoxyribonucleic acid (DNA) in the brain of adult rats subjected to acute administration and chronicle of GNP-10 and GNP-30. Male Wistar rats (60 days old) received a single (acute administration) or repeated intraperitoneal injections once a day for 28 days (chronic administration) of GNP in two sizes or saline. Twenty-four hours after the single or last administration, the animals were killed, the brain was removed and the prefrontal cortex, cerebellum, hippocampus, striatum and cortex were isolated for further evaluation of the activity of the enzymes citrate synthase, malate and succinate dehydrogenase, creatine kinase complex I, II, II-III, IV, superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT), was also assessed levels of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), protein carbonyls, damage frequency (DF) and damage index (ID) to DNA. Acute administration of GNP-10 caused inhibition of the energy metabolism in the hippocampus, striatum, and posterior cortex. Chronic administration of both dimensions cause inhibition of energy metabolism only in posterior cortex. Furthermore, there was a decrease in TBARS and protein carbonylation in rat brain subjected to acute administration. Chronic administration did not alter these parameters. On the other hand, the change in SOD and CAT activity was observed in both administrations. We also note that GNP induces high levels of DNA damage in posterior cortex differently depending on the type of administration and the size of nanoparticles, and acute administration of GNP-10 showed to be less toxic than the GNP-30. However in chronic administration, genotoxicity is the same regardless of the given size, FD and ID DNA showed no statistical differences between groups. Chronic administration had significantly greater damage that acute administration in both sizes. This study showed that chronic and acute administration of GNP caused inhibition of energy metabolism, decreased lipid peroxidation and protein carbonyls, alter the activity of antioxidant enzymes SOD and CAT and caused DNA damage to brain



of rats, differently for each Structure evaluated depending on the size and / or management performed.

**Keywords:** Nanotechnology. Gold nanoparticles. Energy metabolism. Oxidative stress. damage to DNA.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Escala nanométrica.....	40
Figura 2 – Taça de Licurgo (Lycurgus cup).....	42
Figura 3 – Ciclo de Krebs.....	46
Figura 4 – Cadeia respiratória mitocondrial.....	48
Figura 5 – Creatina quinase.....	49
Figura 6 – Formação de espécies reativas de oxigênio, defesa antioxidante e os danos celulares.....	51
Figura 7 – Mutação genética.....	53
Figura 8 – Esquema da distribuição dos grupos.....	59
Figura 9 – Espectros eletrônicos para soluções aquosas de GNP-10 e GNP-30.....	66
Figura 10 – Padrão de DRX (Difratograma) de GNP-10 (reflexões a 38,18°) e GNP-30 (reflexões a 44,39°).....	67
Figura 11 – Microscopia eletrônica de transmissão de GNP-10 e GNP-30.....	68
Figura 12 – Atividade da citrato sintase, malato desidrogenase, succinato desidrogenase e creatina quinase após administração aguda de GNP-10 e GNP-30.....	69
Figura 13 – Atividade dos complexos mitocondriais após administração aguda de GNP-10 e GNP-30.....	70
Figura 14 – Níveis de TBARS e carbonilação de proteínas após administração aguda de GNP-10 e GNP-30.....	71
Figura 15 – Atividade da SOD e CAT após administração aguda de GNP-10 e GNP-30.....	72
Figura 16 – Frequência e índice de dano ao DNA após administração aguda de GNP-10 e GNP-30.....	73
Figura 17 – Atividade da citrato sintase, malato desidrogenase, succinato desidrogenase e creatina quinase após administração crônica de GNP-10 e GNP-30.....	74
Figura 18 – Atividade dos complexos mitocondriais após administração crônica de GNP-10 e GNP-30.....	75
Figura 19 – Níveis de TBARS e carbonilação de proteínas após administração crônica de GNP-10 e GNP-30.....	76
Figura 20 – Atividade da SOD e CAT após administração crônica de GNP-10 e GNP-30.....	77
Figura 21 – Frequência e índice de dano ao DNA após administração crônica de GNP-10 e GNP-30.....	78



Figura 22 – Correlação dos níveis de frequência de dano ao DNA e índice de dano ao DNA após administração aguda e crônica de GNP-10 e GNP-30.....	79
Figura 23 – Relação entre metabolismo energético, estresse oxidativo e dano ao DNA.....	90



## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 – Esquema representativo dos resultados.....	80
---	----



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 8OhdG- 8-hidroxideoxiguanosina, do inglês *8-Oxo-2'-deoxyguanosine*.
- Å- Angstrom.
- Acetil-CoA- Acetil Coenzima A, do inglês *Acetyl Coenzyme A*.
- ADP- Adenosina Difosfato, do inglês *Adenosine Diphosphate*.
- ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
- ATP- Adenosina Trifosfato, do inglês *Adenosine Triphosphate*.
- ATPsintase- Adenosina Trifosfato Sintase, do inglês *Adenosine Triphosphate Synthase*.
- CAT- Catalase.
- DCIP- Dicloroindofenol, do inglês *Dichloroindophenol*.
- DMSO- Dimetilsulfóxido, do inglês *Dimethyl Sulfoxide*.
- DNA- Ácido Desoxirribonucleico, do inglês *Deoxyribonucleic Acid*.
- DNPH- 2,4 Dinitrofenilhidrazina, do inglês *2,4 Dinitrophenylhydrazine*.
- DRX- Difractometria de Raios-x.
- EAA- Espectrometria de Absorção Atômica.
- ERO- Espécies Reativas de Oxigênio.
- FADH<sub>2</sub>- Flavina Adenina Dinucleotídeo Reduzida, do inglês *Reduced Flavin Adenine Dinucleotide*.
- FD- Frequência de Dano.
- GNP- Nanopartícula(s) de ouro, do inglês *Gold Nanoparticles*.
- GSR- Glutaciona redutase, do inglês *Glutathione Reductase*.
- GPx- Glutaciona Peroxidase, do inglês *Glutathione Peroxidase*.
- GSH- Glutaciona Reduzida, do inglês *Glutathione Reduced*.
- GSSG- Glutaciona Oxidada, do inglês *Oxidized Glutathione*.
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- Peróxido de Hidrogênio.
- ID- Índice de Dano.
- NADH- Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Reduzida, do inglês *Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide*.
- NF-κB- Fator Nuclear *kappa* B, do inglês *Factor Nuclear Kappa B*.
- O<sub>2</sub><sup>-</sup> - Ânion Superóxido.
- OH - Radical Hidroxil.
- PBS- Tampão fosfato-salino, do inglês *phosphate buffered saline*.
- RNA- Ácido Ribonucleico, do inglês *Ribonucleic Acid*.
- SNC- Sistema Nervoso Central.
- SNP - Nanopartícula(s) de prata, do inglês *Silver Nanoparticles*.
- SOD- Superóxido Dismutase.
- SPR- Superfície de *Plasmon* Ressonante, do inglês *Surface Plasmon Resonance*.



SPSS- Pacote estatístico para ciências sociais, do inglês *Statistical Package for the Social Science*.

TBA- Ácido Tiobarbitúrico, do inglês *2-Thiobarbituric Acid*.

TBARS- Substâncias Reativas ao Ácido 2-Tiobarbitúrico, do inglês *2-Thiobarbituric Acid Reactive Substances*.

TEM- Microscopia Eletrônica de Transmissão, do inglês *Transmission Electron Microscopy*.

TiO<sub>2</sub>- Dióxido de Titânio.

TLR4- Receptor do tipo *toll 4*, do inglês *Toll-like Receptor 4*.

UV-Vis- Espectroscopia na faixa do Ultravioleta-visível, do inglês *Ultraviolet-visible Spectroscopy*.



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>39</b>
1.1 NANOTECNOLOGIA.....	39
1.2 NANOPARTÍCULAS DE OURO.....	41
1.3 METABOLISMO ENERGÉTICO CEREBRAL.....	45
1.4 ESTRESSE OXIDATIVO.....	49
1.5 DANO AO DNA.....	53
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>56</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	56
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	56
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>57</b>
3.1 SÍNTESE DAS GNP.....	57
3.2 CARACTERIZAÇÃO DAS GNP.....	57
3.2.1 Espectrometria UV-Vis.....	57
3.2.2 Difractometria de Raio-X.....	58
3.2.3 Caracterização Morfológica.....	58
3.2.4 Potencial Zeta e concentração da solução.....	59
3.3 ANIMAIS.....	59
3.4 ADMINISTRAÇÃO DAS GNP.....	60
3.4.1 Administração aguda.....	60
3.4.2 Administração crônica.....	60
3.5 PREPARAÇÃO DO TECIDO E DO HOMOGENEIZADO.....	61
3.6 PARÂMETROS DE METABOLISMO ENERGÉTICO.....	61
3.6.1 Atividade da citrato sintase.....	61
3.6.2 Atividade da malato desidrogenase.....	61
3.6.3 Atividade da succinato desidrogenase.....	61
3.6.4 Atividade da creatina quinase.....	62
3.6.5 Atividade do complexo I.....	62
3.6.6 Atividade do complexo II.....	62
3.6.7 Atividade do complexo II-III.....	63
3.6.8 Atividade do complexo IV.....	63
3.7 PARÂMETROS DE DANO OXIDATIVO E DEFESA ANTIOXIDANTE.....	63
3.7.1 Determinação de TBARs.....	63
3.7.2 Determinação de carbonilação de proteínas.....	63
3.7.3 Atividade da SOD.....	64
3.7.4 Atividade da CAT.....	64
3.8 AVALIAÇÃO DE DANO AO DNA.....	64
3.8.1 Ensaio cometa.....	64
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	65



<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>66</b>
4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS GNP.....	66
4.2 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DE GNP NA ATIVIDADE DAS ENZIMAS DO CICLO DE KREBS E CREATINA QUINASE.....	68
4.3 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DE GNP NA ATIVIDADE DOS COMPLEXOS DA CADEIA RESPIRATÓRIA MITOCONDRIAL.....	69
4.4 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DE GNP EM PARÂMETROS DE DANO OXIDATIVO.....	70
4.5 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DE GNP NA ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES.....	71
4.6 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DE GNP EM PARÂMETROS DE DANO AO DNA.....	72
4.7 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE GNP NA ATIVIDADE DAS ENZIMAS DO CICLO DE KREBS E CREATINA QUINASE .....	73
4.8 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE GNP NA ATIVIDADE DOS COMPLEXOS DA CADEIA RESPIRATÓRIA MITOCONDRIAL .....	74
4.9 EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE GNP EM PARÂMETROS DE DANO OXIDATIVO.....	75
4.10 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE GNP NA ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES.....	76
4.11 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE GNP EM PARÂMETROS DE DANO AO DNA.....	77
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>82</b>
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>92</b>
<b>7 PERSPECTIVAS.....</b>	<b>93</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>94</b>
ANEXO A – Carta de Aprovação do CEUA.....	112

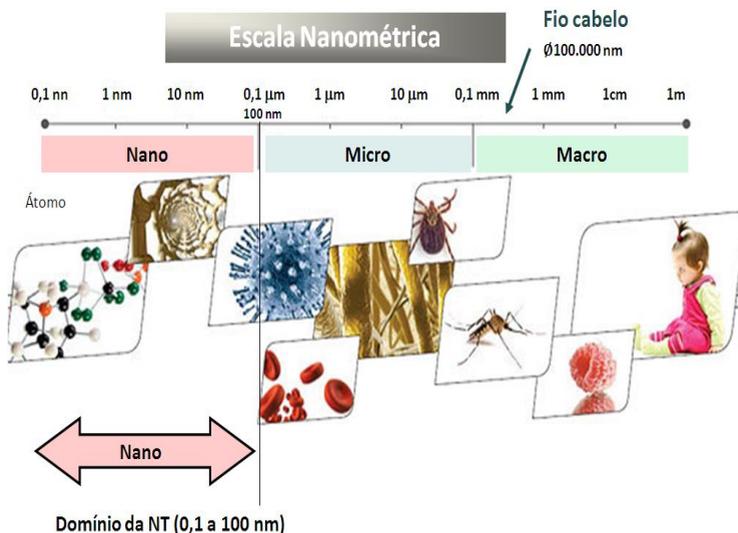


# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 NANOTECNOLOGIA

Nanotecnologia é considerada uma área altamente promissora de crescimento inovador, científico e econômico que abrange muitas áreas da ciência e aplicações tecnológicas (Moore, 2006). A nanotecnologia envolve a manipulação de materiais próximos a escala atômica que visa criar novas estruturas, dispositivos e materiais (Morose, 2010). Esta área de estudo procura reorganizar os átomos de modo que formem estruturas e componentes que melhorem significativamente suas propriedades, físicas, químicas, biológicas, fenômenos e processos devido à sua dimensão nanométrica. (Duran et al., 2006; Roy et al., 2008). Neste sentido, a nanotecnologia é uma ciência que manipula a matéria em uma escala nanométrica (entre 0,1 a 100 nm de diâmetro). O prefixo “nano” vem do grego antigo e tem o significado de “anão”; quando é utilizado como um prefixo para algo diferente de uma unidade de medida, como por exemplo, utilizado na palavra "nanociência", tem o significado relacionado à nanotecnologia, ou a escala dos nanômetros (Bystrzejewska-Piotrowska et al., 2009).

Para efeito ainda de comparação ilustrativa, a escala atômica e molecular de uma estrutura química varia de 0,1 a 1 nano. Os objetos de estudo da nanotecnologia costumam ser medidos em nanômetros, cujo símbolo é "nm". É nesta faixa de comprimento que estão os menores dispositivos construídos pelo homem e onde se encontram os átomos e as moléculas formadas, naturalmente, numa escala nanométrica (fig. 1) (Drexler, 1986; Drexler & Peterson, 1991; Day, 1996; Alivisatos, 1997).



**Fig. 1.** Escala nanométrica. Avaliação comparativa do nanômetro com metro. Adaptado de: [www.cambridge2000.com/gallery/html](http://www.cambridge2000.com/gallery/html).

O interesse em nanomateriais advém da possibilidade de terem suas propriedades físicas e químicas moduladas em função da distribuição de tamanho e geometria das partículas (Bhattacharya & Mukherjee, 2008). A possibilidade de projetar materiais com propriedades pré-estabelecidas é decorrente da nanoescala, sendo a base das diversas aplicações dos nanomateriais (Alkilany & Murphy, 2010), que vem acompanhado de promessas de melhorias no crescimento econômico, saúde, tecnológico e até mesmo na remediação ambiental, oferecendo a perspectiva de grandes avanços que permitem melhorar a qualidade de vida (Moore, 2006).

Por este motivo, houve um enorme incremento na implementação das tecnologias, levando a uma produção de muitos tipos de nanomateriais (Alivisatos, 1996; Tervonen et al., 2009), bem como na expansão das pesquisas em relação ao potencial de aplicações nanotecnológicas em vários domínios, tais como fotônica, catálise, magnetismo e biotecnologia, incluindo cosméticos, produtos farmacêuticos, medicamentos, nanomateriais como transportadores de fármacos ativos e imagens médicas (Jain et al., 2007a).

Neste cenário, as nanopartículas podem ser divididas em orgânicas e inorgânicas. Os componentes celulares e os vírus são bons

exemplos de nanopartículas orgânicas (Maciel et al., 2003). Na literatura, encontram-se facilmente muitos trabalhos envolvendo nanopartículas inorgânicas. Nanopartículas inorgânicas pertencem a uma das classes dos nanomateriais, incluindo aquelas baseadas em óxidos metálicos (óxido de ferro, óxido de cério, dióxido de titânio, dióxido de silício, entre outros) e metais (cobre, níquel, ouro e prata), possuindo uma escala de comprimento no intervalo nanométrico (Sperling et al., 2008). Sua pequena dimensão permite entrar facilmente e atravessar os tecidos, células e organelas, visto que, o tamanho das nanopartículas é semelhante ao de muitas biomoléculas (Fischer & Chan, 2007).

Entretanto, como apontaram Fischer & Chan (2007), as nanopartículas podem não cruzar livremente ou indiscriminadamente todas as barreiras biológicas. Deste modo, as nanopartículas são incorporadas aos materiais a fim de melhorar suas propriedades (Mann, 2006) e algumas são reconhecidas por suas ações antimicrobianas, antifúngicas e antiinflamatórias (Weir et al., 2008).

As propriedades especiais das nanopartículas derivam de sua elevada proporção entre a área de superfície e o volume (Bhattacharya & Mukherjee, 2008). Elas também têm uma porcentagem, consideravelmente mais alta, de átomos em sua superfície, quando comparadas com outras partículas, o que pode torná-las mais reativas e tóxicas (Chen et al., 2006). Neste contexto, dentro da célula, as nanopartículas podem ser acumuladas e provocar efeitos tóxicos a nível celular (Oberdorster et al., 2005) ou à nível de organismo (Avakian et al., 2002; Armstrong et al., 2004). Sendo assim, mesmo fornecendo benefícios para a indústria, há uma preocupação crescente de que as substâncias anteriormente consideradas biologicamente inertes possam, de fato, tornarem-se tóxicas em um estado nanoparticulado devido a sua maior reatividade e, possivelmente, sua maior facilidade de penetração nas células (Reeves et al., 2008).

## 1.2 NANOPARTÍCULAS DE OURO

As nanopartículas de metais de transição externo, apesar de parecer uma tecnologia recente, são bem mais antigas do que se pode imaginar, visto que a taça de Licurgo, relíquia romana do século IV é, provavelmente, o exemplo mais famoso do uso de nanopartículas. Sua cor é devido à presença de nanopartículas de ouro (GNP) e de prata (SNP) em sua estrutura, o que permite a mudança de cor conforme a variação da luz (Freestone et al., 2007) (fig. 2).



**Fig. 2.** Taça de Licurgo (*Lycurgus cup*). Fonte: Figura extraída do site <http://www.cambridge2000.com>.

O ouro tem uma longa história de uso medicinal, sendo utilizado pelos chineses desde 2.500 a.C., sua inclusão no arsenal terapêutico pode servir para remotar a medicina chinesa (Juzenas et al., 2008). O ouro já foi utilizado no passado para o tratamento de doenças como epilepsia e sífilis. Soluções vermelhas de ouro coloidal são utilizadas até hoje na Índia como rejuvenescedores e revitalizantes. O ouro coloidal também já foi usado na medicina para tratamento de tuberculose em 1920 e também foram encontradas grandes aplicações clínicas no tratamento de doenças reumáticas (Bhattacharya & Mukherjee, 2008). Recentemente com o desenvolvimento da nanotecnologia, a utilização do ouro na medicina, principalmente em estudos envolvendo diagnósticos e terapias do câncer, na entrega de fármacos e na indústria alimentar (Tedesco et al., 2010), tem crescido rapidamente nos últimos anos.

Além disso, o ouro apresenta-se vantajoso devido a sua propriedade de biocompatibilidade, uma síntese relativamente simples, o controle do tamanho das nanopartículas, a facilidade de modificação química de sua superfície, e a facilidade de caracterização devido à presença de uma banda de superfície *plasmon* ressonante (Jain et al., 2007b). Sabendo que as propriedades químicas e físicas das

nanopartículas dependem de fatores como o tamanho, a composição, a forma, a razão de aspecto e a natureza da sua superfície (Huang et al., 2006; Bhattacharya & Mukherjee, 2008). São então as variáveis determinantes para o sucesso no desenvolvimento das nanopartículas de ouro que possam ser utilizadas em terapias químicas.

Aliado a isso, as GNP são estudadas mais intensamente, principalmente por serem um dos nanomateriais mais utilizados na terapêutica de bioimagem e biomedicina (Jain et al., 2007a; Sperling et al., 2008). As GNP emergiram como sendo um excelente agente capaz de se ligar a pequenas e grandes biomoléculas (Fischer & Chan, 2007). A penetração de GNP em membranas celulares é facilitada por sua escala nanométrica, podendo ter muitas finalidades nas aplicações biomédicas (Ghosh et al., 2008). Em especial, as GNP têm uma de suas aplicações voltada a diagnóstico e tratamento do cancro e entrega de medicamentos (Tedesco et al., 2010), bem como, o ouro coloidal e alguns dos seus compostos têm propriedades terapêuticas reconhecidas, especialmente para o tratamento de processos inflamatórios e artríticos (Kim et al., 2007). Recentemente, estudos em nosso laboratório demonstraram a ação antiinflamatória de GNP no tratamento de lesão tendinea (Dohnert et al., 2012) e lesão muscular (Victor et al., 2012) em modelo animal. Além de uma administração tópica de GNP provocar a diminuição da inflamação intraocular e dos danos oxidativos em um processo inflamatório ocular induzida por lipopolissacarídeo provocando uma interferência no caminho do receptor do tipo *toll* 4 (TLR4) / e do fator nuclear *kappa* B (NF- $\kappa$ B) (Pereira et al., 2012).

Neste cenário, estudos vêm demonstrando a forte afinidade da ligação entre GNP e grupos tióis e aminas facilitando associação com fármacos, bem como sua conjugação com biomoléculas, por exemplo, o ácido desoxirribonucleico (Katz & Willner, 2004; Ojea-Jiménez & Puentes, 2009).

Apesar da ampla variedade de aplicações, pouco se sabe sobre a toxicidade das GNP à saúde humana, especialmente ao sistema nervoso central. Devido às suas dimensões, as nanopartículas têm a capacidade de ultrapassar a barreira hemato-encefálica (Hu & Gao, 2010), sendo este um sistema que protege o cérebro, separando-a do contato direto com a circulação do sangue (Barbu et al., 2009). Todavia, ao fazê-lo, impede o acesso de um grande número de agentes de diagnósticos e terapêuticos em distúrbios neurológicos (Barbu et al., 2009). Nanopartículas metálicas podem ser preparadas em diversas formas e dimensões, de modo que possam superar essa barreira física e entrar no cérebro (Kreuter, 2001; Kreuter, 2004; Koziara et al., 2006).

Estudos mostram que administração de GNP menores que 12 nm de diâmetro podem atravessar a barreira hemato-encefálica de camundogos (Oberdorster et al., 2004; Sarin et al., 2008). É possível vislumbrar novas terapias para doenças neurológicas baseadas na associação entre nanopartículas e fármacos. Porém, os efeitos tóxicos das nanopartículas sobre o sistema nervoso central (SNC) são pouco compreendidos. A neurotoxicidade induzida por nanopartículas é um tema que requer mais atenção (Hu & Gao, 2010).

Estudo de Sonavane et al. (2008), mostrou que a administração intravenosa de GNP em camundogos, no tamanho entre 15 e 50 nm, foi capaz de ultrapassar a barreira hemato-encefálica, sendo que a distribuição de GNP nos tecidos é tamanho-dependente, ou seja, a GNP no tamanho de 15 nm se mostrou mais difundida. Tedesco et al. (2010), demonstraram aumento da peroxidação lipídica após exposição de *Mytilus edulis* em tanques com 750 ppb de GNP 5,3 nm por 24 horas. Pan et al. (2009), constataram que 1,4 nm de nanoesferas de ouro incubadas por 6 e 12 horas apresentaram indicadores de estresse oxidativo, espécies reativas de oxigênio, potencial e integridade mitocondrial, bem como substratos mitocondriais comprometidos. Curiosamente, não encontraram evidência de danos celulares para nanoesferas de ouro no tamanho de 15 nm.

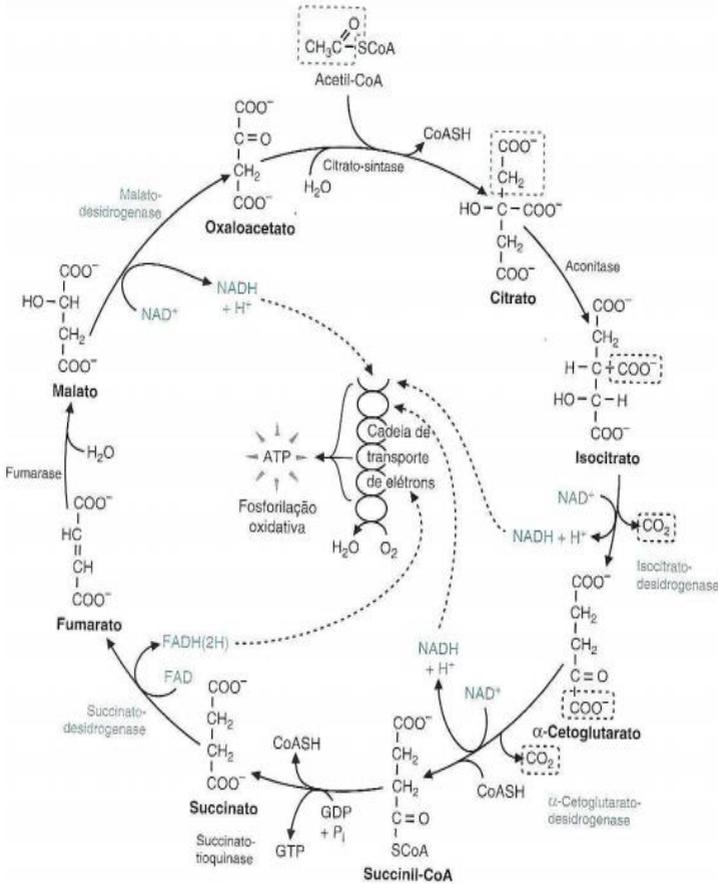
Estudo de Paula et al. (2009), mostrou que SNP (10, 25 e 50 mg.L<sup>-1</sup>) *in vitro* inibiram a atividade da creatina quinase em tecido cerebral de ratos e, Costa et al. (2010), mostraram que a SNP inibiu *in vitro* a atividade dos complexos I, II, III e IV da cadeia respiratória mitocondrial também no tecido cerebral de ratos nas mesmas concentrações. Estudo de Rahman et al. (2009) mostrou que SNP, 25 nm, podem induzir neurotoxicidade através da geração de radicais livres, alteração da expressão gênica e apoptose. Além disso, estudo de Ma et al. (2010) demonstrou que nanopartículas de dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>) induz, dose dependente, peroxidação lipídica, diminuição da atividade das enzimas antioxidantes e aumento da liberação de óxido nítrico em cérebro de camundongos.

Brown et al. (2001), concluíram em seus estudos que a área de superfície muito grande de partículas ultra-pequenas pode resultar na geração direta de espécies reativas de oxigênio (EROs). Sendo que estas podem causar danos celulares por atacar o ácido desoxirribonucleico (DNA), proteínas e membranas celulares, além de provocar alterações no citoplasma, função mitocondrial e núcleo (Lewinski et al., 2008).

### 1.3 METABOLISMO ENERGÉTICO CEREBRAL

O cérebro desenvolve uma intensa atividade metabólica, porém possui uma pequena reserva energética em relação ao grande consumo de glicose, existindo assim uma necessidade contínua de substratos (Dickinson, 1996). A glicose é o principal metabólito energético utilizado pelo cérebro (Erecinska & Silver, 1994). A glicose entra na célula e pode ser metabolizada em diferentes rotas. No entanto, a principal via de degradação da glicose é a glicólise. Esta via é composta por uma sequência de dez reações enzimáticas e tem como produto final o piruvato, cuja função no metabolismo energético é fornecer parte da energia utilizada pelos organismos (Clark et al., 1993; Lehninger et al., 2007; Berg et al., 2008). Em condições aeróbicas, o piruvato é transportado para dentro da mitocôndria e sofre uma descarboxilação oxidativa, formando a acetil coenzima A (acetil-CoA) (Lehninger et al., 2007; Berg et al., 2008).

A acetil-CoA, formada a partir do piruvato, é oxidada a dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) pelo ciclo de Krebs, através de uma série de reações compostas por oito passos e catalisadas por diferentes enzimas (Lehninger et al., 2007; Berg et al., 2008). O ciclo de Krebs inicia com a condensação da acetil-CoA com oxaloacetato e, após uma volta completa, o ciclo produz duas moléculas de  $\text{CO}_2$ , três de nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH), uma de flavina adenina dinucleotídeo reduzida ( $\text{FADH}_2$ ) e um composto de alta energia, guanosina trifosfato (GTP) (fig. 3) (Voet et al., 2002).



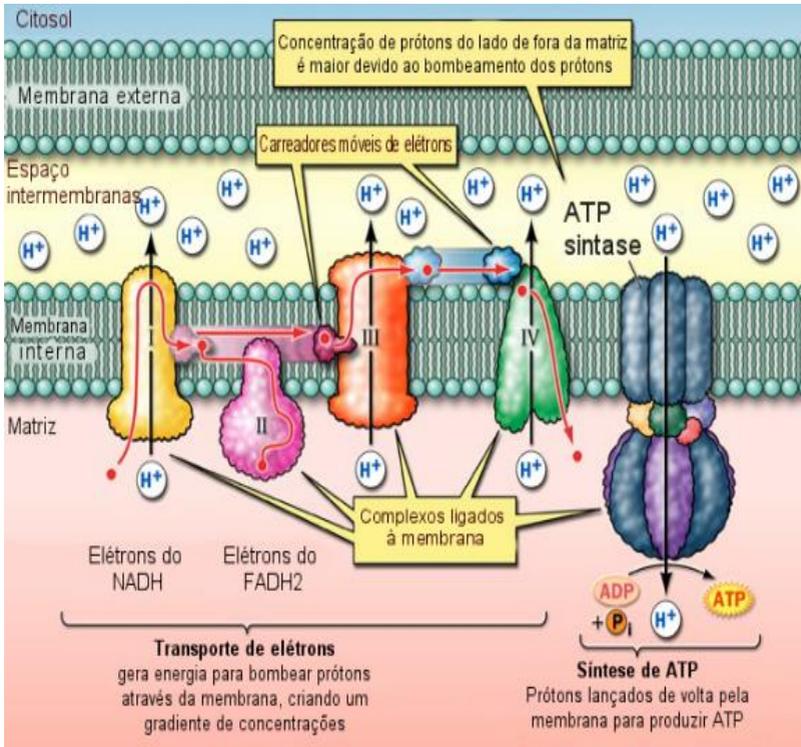
**Fig. 3.** Figura ilustrativa do ciclo de Krebs. Fonte: Figura extraída do livro de bioquímica Smith et al., 2007.

A ação combinada do ciclo de Krebs e da fosforilação oxidativa gera grande parte do ATP (adenosina trifosfato) necessário ao cérebro (Erecinska & Silver, 1994). É conhecido que, no cérebro, a fosforilação oxidativa fornece em torno de 95% de todo o ATP sintetizado. Neste contexto, a mitocôndria é a organela intracelular que mantém os suprimentos de energia para o cérebro.

A mitocôndria é envolvida por duas membranas, uma externa e uma interna. A membrana externa é lisa e reveste o espaço intermembranas, enquanto que a membrana interna possui múltiplas invaginações, denominadas cristas mitocôndriais e reveste a matriz

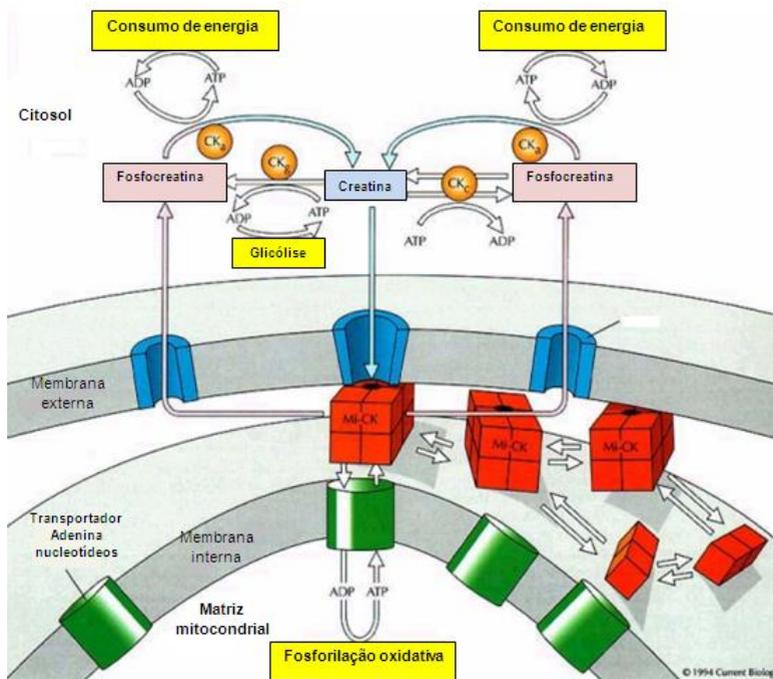
mitocondrial. No espaço intermembranas estão localizadas proteínas de grande importância fisiológica, com funções importantes para o metabolismo energético como o citocromo *c* e a creatina quinase. Ainda, aderido às cristas mitocôndriais encontra-se uma grande quantidade de proteínas componentes da cadeia transportadora de elétrons e a adenosina trifosfato sintase (ATP sintase), além de várias proteínas transportadoras (Daum, 1985; Devlin & Michelacci, 2003). No seu interior, matriz mitocondrial, localizam-se as enzimas do ciclo de Krebs, da  $\beta$ -oxidação dos ácidos graxos, ácido ribonucleico (RNA), ribossomos e DNA mitocondrial (Daum, 1985; Frey & Mannella, 2000; Reddy, 2008).

A maior parte do ATP formado na célula provém da cadeia transportadora de elétrons acoplada à fosforilação oxidativa mitocondrial. A cadeia transportadora de elétrons é um complexo enzimático responsável pela gradativa transferência de elétrons provenientes do metabolismo intermediário para a redução do oxigênio ( $O_2$ ) e síntese de ATP (Huttemann et al., 2008). Durante este processo, os elétrons provenientes das coenzimas NADH e  $FADH_2$ , reduzidas durante o ciclo de Krebs, são transferidos para os complexos I e II, respectivamente, e destes para os complexos II-III e IV de maneira gradativa, até o acceptor final de elétrons, o  $O_2$  molecular, com concomitante formação de água ( $H_2O$ ). A passagem de elétrons através dos complexos I, III e IV é acompanhada do bombeamento de prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas. Este gradiente eletroquímico, responsável pela formação do potencial de membrana mitocondrial, dirige o fluxo de prótons de volta à matriz mitocondrial através da ATP sintase, que utiliza esta energia para a síntese de ATP (Huttemann et al., 2008), (Fig 4).



**Fig. 4.** Figura ilustrativa da cadeia respiratória mitocondrial. Fonte: Nelson et al., 2000.

Um mecanismo que auxilia na manutenção dos níveis cerebrais de ATP é o sistema da creatina quinase. A creatina quinase é uma enzima presente tanto no citoplasma quando ligada às membranas mitocondriais e catalisa a transferência reversível de um fosfato entre a fosfocreatina e o ATP (fig. 5). O alto fluxo da reação na direção da síntese de ATP, em situações de consumo, indica que a reação é crucial para a manutenção de concentrações constantes dos substratos energéticos no citoplasma. O sistema creatina/fosfocreatina/creatina quinase está associado a algumas funções particularmente importantes para o cérebro: tamponamento energético e transferência de ATP de sítios de produção para outros de consumo (Erecinska & Silver, 1994).



**Fig. 5.** Figura ilustrativa da transferência do grupo fosfato do ATP com a creatina, em vermelho creatina quinase (CK). Fonte: Wyss & Kaddurah-Daouk, 2000, Adaptado pelo autor.

Diante disso, uma alteração funcional na mitocôndria pode levar, portanto, a alterações patológicas nos neurônios (Beal, 1995; Bowling & Beal, 1995; Davis et al., 1995). Mutações no DNA mitocondrial e reações envolvendo geração de EROs podem danificar a mitocôndria e diminuir a atividade dos complexos da cadeia transportadora de elétrons. Sendo assim, uma diminuição no transporte de elétrons, além de causar um prejuízo na produção de ATP, leva a uma dispersão dos elétrons na forma de radicais livres potencialmente danosos às células (Halliwell, 1987; Kuloglu et al., 2002).

#### 1.4 ESTRESSE OXIDATIVO

Todas as células aeróbicas podem sofrer dano oxidativo, porém o cérebro é particularmente susceptível a este dano. Colabora para isso o fato de o cérebro utilizar altas taxas de oxigênio quando comparado a

outros órgãos; suas defesas antioxidantes serem modestas; muitos neurotransmissores serem auto-oxidantes; as mitocôndrias neuronais gerarem ânion superóxido ( $O_2^-$ ) e as membranas neuronais serem ricas em ácidos graxos poliinsaturados além dos produtos da peroxidação lipídica poderem causar dano cerebral (Halliwell, 1987; Kuloglu et al., 2002).

Nesta conjuntura, o estresse oxidativo é caracterizado como o desequilíbrio entre a geração de espécies oxidantes e as defesas antioxidantes, ocasionando um potencial dano oxidativo em todas as biomoléculas (Halliwell & Gutteridge, 1999; Dalle-Donne et al., 2006).

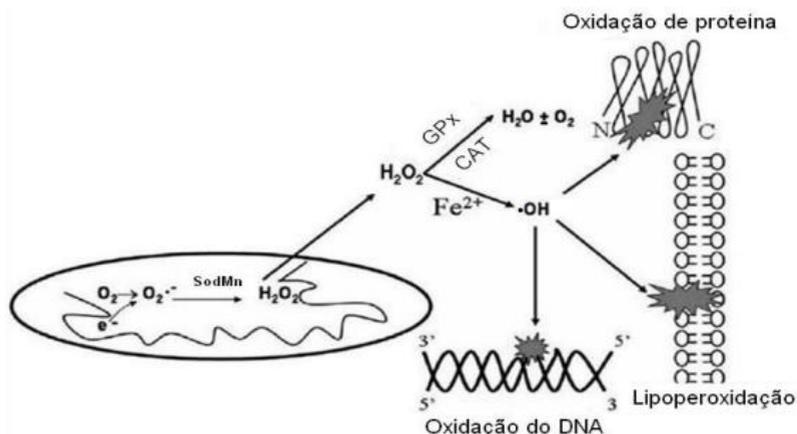
Os radicais livres, agentes oxidantes, são definidos como qualquer espécie química capaz de existir, independentemente, e que contenham um ou mais elétrons desemparelhados (Southorn & Powis, 1988; Halliwell, 1994; Halliwell, 1999; Halliwell & Gutteridge, 2007), o que confere alta reatividade a essas espécies devido a situação energeticamente instável (Maxwell, 1995). Ainda, tais radicais podem ser formados em situações fisiológicas ou patológicas (Halliwell, 1994; Peres et al., 2000), podendo o balanço entre os agentes oxidantes e as defesas antioxidantes manter-se equilibrado ou ocorrer um aumento na produção de EROs, diminuição das defesas antioxidantes ou ambas as situações, com conseqüente rompimento do equilíbrio entre oxidantes e antioxidantes. Nessa situação, diz-se que a célula ou o organismo encontra-se sob estresse oxidativo com potenciais danos (Barp et al., 2002). Em caso de estresse oxidativo brando e passageiro a célula pode adaptar-se aumentando a produção de antioxidantes, porém em situações severas a célula em geral evolui para um caso de necrose ou apoptose (Halliwell & Gutteridge, 2007).

Em condições fisiológicas,  $O_2$  sofre redução tetravalente, resultando na formação de  $H_2O$ . Entretanto, aproximadamente 5% do  $O_2$  utilizado na cadeia transportadora de elétrons não é completamente reduzido, podendo ser convertido a intermediários reativos. A molécula de  $O_2$  mantém-se unida ao complexo IV da cadeia transportadora de elétrons até que ocorra sua redução total (Boveris & Chance, 1973).

Desse modo, a formação de EROs deve-se ao fato do  $O_2$  sofrer redução monovalente, o que permite a geração de moléculas ou íons reativos durante o processo de redução do  $O_2$  (Thannickal & Fanburg, 2000). Sendo assim,  $O_2$  é, primeiramente, reduzido a  $O_2^-$ . Em seguida, a enzima superóxido dismutase (SOD) reduz o  $O_2^-$  a peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (Halliwell & Gutteridge, 2007). Uma vez que o  $H_2O_2$  é formado, esse deve ser reduzido à  $H_2O$  para prevenir a formação do

radical hidroxil ( $\text{OH}^\cdot$ ) pela reação de Fenton ou de Haber-Weiss (McCord, 1987; Gutteridge & Halliwell, 2000).

Uma das enzimas capaz de reduzir o  $\text{H}_2\text{O}_2$  é a catalase (CAT). A glutatona peroxidase (GPx) também consegue eliminar o  $\text{H}_2\text{O}_2$  pelo acoplamento da sua redução à  $\text{H}_2\text{O}$  com a oxidação da glutatona reduzida (GSH). O produto dessa reação, glutatona oxidada (GSSG), consiste de duas GSH ligadas por uma ponte dissulfeto, e pode ser convertido novamente a GSH pela enzima glutatona redutase (GSR) (Halliwell, 2006), conforme figura 6.



**Fig. 6.** Figura ilustrativa da formação de espécies reativas de oxigênio, defesa antioxidante e os danos celulares. Fonte: Ramakrishnan et al., 2007.

As EROs estão, constantemente, sendo formadas na célula. Algumas são produzidas como produtos acidentais de reações enzimáticas normais, que escapam do sítio ativo de enzimas que contêm metais durante reações de oxidação. Outros, como o  $\text{H}_2\text{O}_2$ , são produtos fisiológicos de oxidases (Smith et al., 2005). Como mecanismo compensador do processo oxidativo, o organismo possui um sistema antioxidante, que atacam conjuntamente na proteção celular (Halliwell, 1999).

Todavia, as defesas antioxidantes não são 100% efetivas, já que o dano oxidativo a lipídeos, proteínas, DNA e outras moléculas pode ser demonstrado nos sistemas vivos em ambiente aeróbico. Assim, alguns autores classificam como defesa antioxidante os sistemas de reparo necessários para lidar com moléculas danificadas (reparo ao DNA) ou para

degradar lipídeos e proteínas danificadas (Halliwell & Gutteridge, 2007).

O alvo celular primário do estresse oxidativo pode variar conforme o tipo celular, as espécies reativas geradas, o sítio de geração (intra ou extracelular) e a proximidade do oxidante à estrutura celular. Diante disso, as EROs extraem elétrons de outros compostos para poder completar seus próprios orbitais, iniciando assim, uma reação em cadeia (Smith et al., 2005), visto que os elétrons não pareados neste orbital conferem alta reatividade à molécula, a qual apresenta forte tendência a adquirir um segundo elétron para esse orbital (Smith et al., 2005).

O ataque das EROs aos lipídeos das membranas desencadeia um processo chamado lipoperoxidação, formando muitos produtos secundários, entre eles o malondialdeído (Urso & Clarkson, 2003). As EROs podem modificar a conformação química inicial dos ácidos graxos poliinsaturados e, conseqüentemente, alterar a coesão, fluidez, permeabilidade e funções metabólicas das células (Chihuailaf et al., 2002).

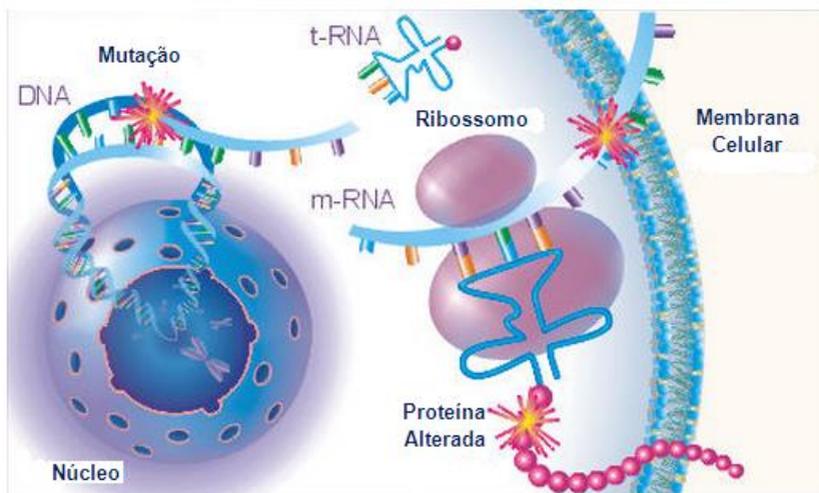
A oxidação direta de proteínas por EROs produz derivados carbonilados altamente reativos, resultando na oxidação das cadeias laterais de diversos aminoácidos (Dalle-Donne et al., 2006). Adicionalmente, a quantificação de proteínas carboniladas apresenta uma vantagem sobre os produtos da lipoperoxidação como marcador de estresse oxidativo, pois as proteínas oxidadas geralmente são mais estáveis (Dalle-Donne et al., 2003).

Além disso, as EROs também são as principais fonte de dano ao DNA, sendo que este dano gera várias classes de produtos que podem ser identificadas, incluindo os produtos de oxidação de bases e os produtos de fragmentação (quebra de fita simples ou dupla), ligações cruzadas e produtos de fragmentação de açúcares (Cooke et al., 2006).

O estresse oxidativo tem sido identificado como um mecanismo de toxicidade de nanopartículas (Li et al., 2008) e esses efeitos tóxicos envolvem principalmente o aumento da geração de EROs (Siddiqi et al., 2012), sendo que estas espécies formadas podem exercer efeitos nocivos sobre as células e organismos (Halliwell, 1994; Peres et al., 2000), levando a processos oxidativos dando origem a efeitos citotóxicos, inibição da atividade metabólica e possíveis danos ao DNA (Lapresta-Fernández et al., 2012).

## 1.5 DANO AO DNA

O DNA é uma molécula constituída de uma base orgânica, uma pentose (desoxorribose) e um grupo fosfato. A esta molécula é atribuída à função de carregar a informação transcripcional de todas as biomoléculas do organismo. Entretanto, os milhões de nucleotídeos que a constitui são vulneráveis ao ataque de outros agentes químicos, resultando em alterações na sua propriedade codificantes (fig. 7) (Clausen-Schaumann et al., 2000).



**Fig. 7.** Figura ilustrativa da mutação genética onde um dano ao DNA acaba rompendo a dupla hélice, comprometendo o mRNA que vai alterar a formação protéica, alterando a proteína, gerando um erro basal, liberando uma proteína errônea e comprometendo a atividade dos complexos ou até mesmo levando a uma mutação ou ainda morte celular. Fonte: <http://www.sciencemuseum.org.uk>.

A mutação pode ser definida como qualquer mudança na sequência de nucleotídeos ou arranjo do DNA e é classificada em mutações genômicas (afetam o número de cromossomos na célula), mutações cromossômicas (alteram a estrutura de cromossomos individuais) e mutações gênicas (alteram genes individuais) (Nussbaum et al., 2002).

Células normais são capazes de reparar as lesões no DNA com precisão através de um ou mais processos diferentes. O DNA danificado e não reparado pode acarretar em defeitos na transcrição e replicação da

molécula, resultando em uma série de transtornos, incluindo a morte celular, o câncer e mudanças hereditárias via mutagênese, com sérias implicações evolutivas (Kornhauser et al., 1991). A manutenção da integridade do genoma e a capacidade de reparação do DNA decorrente de danos que ocorrem devido a fatores internos e externos são, portanto, um dos requisitos de qualquer organismo para sobreviver e manter a estabilidade das espécies (Kornhauser et al., 1991).

Um dos testes mais utilizados para verificar a potencial genotóxico de uma substância é o Ensaio Cometa. Ele é capaz de detectar danos ao DNA induzidos por agentes alquilantes, intercalantes e oxidantes (Silva et al., 2003). Esse teste não detecta mutações, mas sim lesões genômicas que, após serem processadas, podem resultar em mutações. Tais lesões são passíveis da correção e, dessa maneira, esse teste também pode ser utilizado para estudos de reparo no DNA, trazendo informações importantes sobre a cinética e o tipo de lesão reparada, embora não possibilite inferir a fidedignidade do processo de reparo (Gontijo & Tice, 2003; Gameiro, 2005). Esse ensaio vem sendo amplamente utilizado na avaliação de genotoxicidade de novos fármacos, no monitoramento ambiental e no biomonitoramento humano (Faust et al., 2004; Brendler-Schwaab et al., 2005; Kumaravel & Jha, 2006; Moller, 2006; Burlinson et al., 2007; Guerci et al., 2007) e nas pesquisas sobre danos e reparação de DNA (Speit & Hartmann, 1999; Hartmann et al., 2003; Collins, 2004; Moller, 2006; Burlinson et al., 2007; Collins, 2007; Gaivão et al., 2007; Guerci et al., 2007).

Considerando as propriedades antiinflamatórias e a baixa toxicidade das GNP (Shukla et al., 2005), vários estudos estão sendo realizados em nosso grupo de pesquisa utilizando fonoforese e/ou iontoforese com aplicação tópica de GNP-10 associada a gel de diclofenaco para o tratamento de lesões musculares e tendinosas em ratos, utilizando ultrassom (Dohnert et al., 2012; Victor et al., 2012), bem como, para tratamento antiinflamatório tópico intra-ocular em modelo animal de uveíte (Pereira et al., 2012). Esses estudos apresentam-se promissores e indicam a possibilidade de utilização destas novas terapias para o tratamento destas lesões ou reações inflamatórias nos seres humanos.

No entanto, avanços nos estudos sobre nanotecnologia e interação de nanomateriais com o sistema biológico, abrem possibilidades de diversas aplicações e vantagens, às vezes, inerentemente, eles podem apresentar efeitos tóxicos à saúde humana. Neste sentido é de fundamental importância investigar o potencial funcional e tóxico das mesmas a nível cerebral.

O número de publicações específicas sobre nanotoxicologia tem diminuído em comparação a nanotecnologia. A maioria destes estudos avaliou principalmente a citotoxicidade, assim, em muitos casos, doses muito elevadas de exposição foram necessárias. No entanto, estas investigações negligenciaram as alterações celulares sutis que podem surgir em concentrações mais baixas, que não resultam em morte celular, mas podem contribuir para riscos a saúde humana (Singh et al., 2009).

Apesar da neurotoxicidade de GNP ser um tema novo e que requer atenção, as nanopartículas são amplamente utilizadas. Está bem descrito na literatura a importância do metabolismo energético na manutenção dos níveis de ATP cerebral, e que um dano neste sistema pode resultar num desequilíbrio oxidativo, bem como em dano ao DNA, o que pode acarretar sérias consequências ao indivíduo. Com base nisso, o presente estudo se faz necessário para melhor avaliar os efeitos do GNP sobre estes marcadores em tecido cerebral, no sentido de adquirir esclarecimentos adicionais relacionados a futuras pesquisas sobre o potencial risco associados à nanotecnologia que podem ser atribuíveis, em grande parte, ao aumento das possibilidades de tratamentos e aplicações biomédicas com segurança, devendo ser uma linha ativa de pesquisa.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da administração aguda e crônica de GNP de 10 e 30 nm sobre parâmetros bioquímicos em cérebro de ratos Wistar.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar e caracterizar GNP nos tamanhos de 10 e 30 nm;
- Avaliar o efeito da administração aguda e crônica de GNP-10 e GNP-30 sobre parâmetros de metabolismo energético (citrito sintase, malato desidrogenase, succinato desidrogenase, creatina quinase, complexo I, II, II-III e IV) no córtex pré-frontal, cerebelo, hipocampo, estriado e córtex posterior de ratos;
- Avaliar o efeito da administração aguda e crônica de GNP-10 e GNP-30 em parâmetros de dano oxidativo (TBARS e carbonilação de proteínas) no córtex pré-frontal, cerebelo, hipocampo, estriado e córtex posterior de ratos;
- Avaliar o efeito da administração aguda e crônica de GNP-10 e GNP-30 sobre a atividade antioxidante das enzimas SOD e CAT no córtex pré-frontal, cerebelo, hipocampo, estriado e córtex posterior de ratos;
- Avaliar o efeito da administração aguda e crônica de GNP-10 e GNP-30 sobre o dano ao DNA no córtex posterior de ratos.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 SÍNTESE DAS GNP

GNP de tamanhos médios de 10 e 30 nm foram sintetizadas como descrito por Turkevich e colaboradores (Turkevich et al., 1951) com pequenas modificações, a partir de redução química do precursor metálico ácido tetracloroáurico ( $\text{HAuCl}_4$ ) (Sigma-Aldrich, MO, EUA) com o agente redutor e estabilizante citrato de sódio di hidratado ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) (Nuclear, SP, Brasil). O controle dimensional das nanopartículas foi efetuado variando-se a concentração do agente redutor.

Estudos prévios variando-se sistematicamente as concentrações de citrato de sódio foram efetuados até se obter GNP nas duas dimensões desejadas. Soluções de citrato de sódio nas concentrações de 136,0 e 8,5 mM foram usadas para obter os diâmetros médios de GNP-10 e GNP-30, respectivamente.

Inicialmente, 100 mL de 0,50 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, previamente preparada, foi então adicionada, e o sistema foi mantido à temperatura descrita, agitando a 200 rpm durante 20 minutos. As soluções adquirem as colorações correspondentes a cada tamanho de GNP sintetizadas apresentando um pH de 6,50 (GNP-10) e 2,80 (GNP-30). Por conseguinte, o pH de ambas soluções foram ajustadas para o pH fisiológico com uma solução tampão e, posteriormente, centrifugadas (13.000 rpm por 15 min), seguidas pela remoção do sobrenadante e enxague duas vezes com água ultrapura e, finalmente, disperso em solução salina (NaCl 0,9 %), a concentração da solução foi ajustada e armazenados a 7 °C até serem usados.

#### 3.2 CARACTERIZAÇÃO DAS GNP

##### 3.2.1 Espectrometria UV-Vis

Após a síntese, as soluções de GNP foram caracterizadas 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 no espectrofotômetro utilizando uma cubeta de quartzo contendo uma alíquota de 1 mL com cada uma das soluções. O espectro eletrônico das soluções foi monitorado diariamente, durante uma semana, no intuito de revelar qualquer alteração do comprimento de onda na máxima absorção.

### 3.2.2 Difratometria de Raio-X

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 foi removido e o material sedimentado transferido para uma 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 (Yan et al., 2005).

$$\text{Equação de Scherrer: } D = \frac{K \lambda}{\beta \cos(\theta)}$$

Onde, D é Diâmetro médio, K = 0,94, uma constante característica das partículas esféricas,  $\lambda$  é comprimento onda (raios-x usado): 1,54056,  $\beta$ : Largura da banda a meia altura (total na metade máxima do pico em radianos) e  $\theta$ : Ângulo de Bragg (do pico de 100% de intensidade) (Aromal & Philip, 2012).

### 3.2.3 Caracterização Morfológica

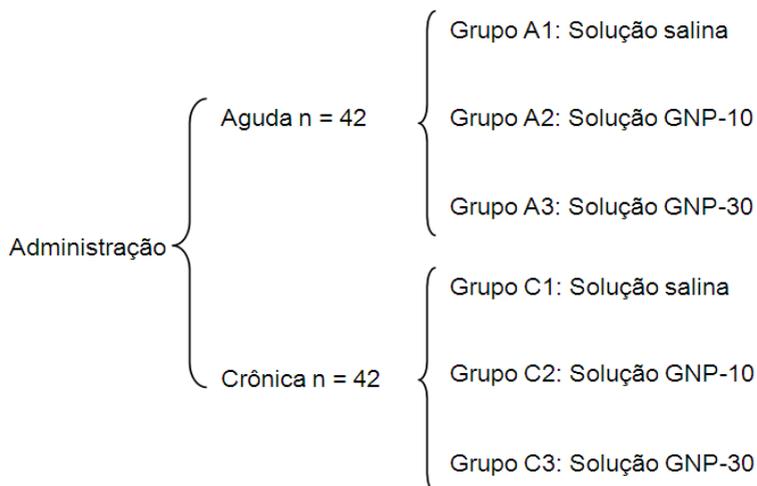
A caracterização morfológica das nanopartículas empregadas neste estudo foi efetuada com auxílio de um microscópio de transmissão eletrônica JEOL Titan 80-300 kV. As amostras foram preparadas da seguinte forma: imediatamente após a síntese, uma alíquota de solução de GNP foi diluída até obter absorvância inferior a 0,10 e transferida para um tubo Eppendorf que foi mantido em banho ultrassônico por 15 minutos. Em seguida, um porta amostra de cobre foi imerso na solução e deixado secar ao ar por 12 h. A curva de distribuição de partículas foi efetuada selecionando-se uma região do porta-amostras contendo GNP bem dispersas.

### 3.2.4 Potencial Zeta e concentração da solução

A análise do Potencial Zeta (ZetaPALS; Brookhaven Instruments, Nova Iorque, EUA) foi utilizado para medir os potenciais Zeta das GNP. A temperatura foi mantida a 25 °C. A concentração de ouro nas soluções de GNP foi determinada por espectrometria de absorção atômica (EAA) utilizando um espectrofotômetro modelo AA240 FS-FAST SEQUENTIAL ATOMIC ABSORPTION SPECTROMETER marca VARIAN.

### 3.3 ANIMAIS

Foram utilizados 84 ratos (14 animais por grupo), machos (250-300 g) com idade de 60 dias obtendo-se do biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC). Os animais foram randomizados e divididos em seis grupos, três grupos para administração aguda e três grupos para administração crônica assim distribuídos: solução salina (grupo 1), solução aquosa de GNP-10 (grupo 2) e solução aquosa de GNP-30 (grupo 3), conforme esquematizado na figura 8. Os animais tiveram livre acesso à comida e água, sendo mantidos em ciclo claro/escuro de 12 horas, com temperatura controlada entre 22°C ± 1°C.



**Fig. 8.** Esquema da distribuição dos grupos. Fonte: o autor

Os experimentos foram realizados após aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da UNESC sob o protocolo nº 03/2012 e

seguiram os Princípios de Cuidados de Animais de Laboratório (*Principles of Laboratory Animal Care*, Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos da América, NIH, publicação número 85-23, revisada em 1996), (Anexo A).

O descarte de animais utilizados neste experimento foi através do acondicionamento em saco branco leitoso e encaminhado para freezer (conservação) na universidade. Após conservação, foram coletados e transportados por empresa terceirizada. Os resíduos foram tratados fisicamente e posteriormente encaminhados para disposição final em aterro sanitário. Todos os procedimentos foram realizados conforme RDC nº 306/2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

### 3.4 ADMINISTRAÇÃO DAS GNP

A solução de GNP com concentração  $70 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  nos tamanhos médios de 10 e 30 nm foram administradas intraperitonealmente, usando-se uma seringa de insulina de 1 ml, na dose de  $70 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  em ratos Wistar adultos. Os tamanhos e a dose foram determinados com base em estudos realizados previamente pelo grupo, a partir do resultado de outras soluções de nanopartículas que foram sintetizados pelo mesmo laboratório.

#### 3.4.1 Administração aguda

Os animais receberam uma única administração intraperitoneal de solução salina ou GNP (10 ou 30 nm). Vinte e quatro horas após a administração os animais foram mortos por decapitação, o cérebro removido e o córtex pré-frontal, cerebelo, hipocampo, estriado e córtex posterior foram isolados para as análises bioquímicas.

#### 3.4.2 Administração crônica

Os animais receberam, uma vez ao dia, por 28 dias, administrações intraperitoneais de solução salina ou GNP (10 ou 30 nm). Vinte e quatro horas após a última administração os animais foram mortos por decapitação, o cérebro removido e o córtex pré-frontal, cerebelo, hipocampo, estriado e córtex posterior foram isolados para as análises bioquímicas.

### 3.5 PREPARAÇÃO DO TECIDO E DO HOMOGENEIZADO

As estruturas cerebrais córtex pré-frontal, cerebelo, hipocampo, estriado e córtex posterior foram removidas e homogeneizadas (1:10, w/v) em tampão de SETH, pH 7,4 (250 mM de Sacarose, 2 mM de EDTA, 10 mM Trizma base, 50 UI/ml de Heparina). Os homogenatos foram centrifugados a 800 x g durante 10 min a 4 ° C, e os sobrenadantes foram armazenados a -70 °C até a determinação da atividade das enzimas. O período máximo entre a preparação do homogeneizado e a análise das enzimas foi inferior a 5 dias. O teor de proteína foi determinado de acordo com o método descrito por Lowry et al. (1951), utilizando albumina bovina como padrão de proteína

### 3.6 PARÂMETROS DE METABOLISMO ENERGÉTICO

#### 3.6.1 Atividade da citrato sintase

A atividade da citrato sintase foi avaliada de acordo com o método de Faloona & Srere (1969), em meio de incubação contendo 100 mM Trizma base, pH 8,0, 100 mM de acetil-CoA, 100 mM de 5,5'-di-tio-bis-(ácido 2 - nitrobenzóico), 0,1% de Triton X-100 e 2-4 µg de proteína do sobrenadante. A reação foi iniciada pela adição de oxaloacetato e acompanha em 412 nm. A atividade foi expressa em nmol/min x mg de proteína.

#### 3.6.2 Atividade da malato desidrogenase

A atividade da malato desidrogenase foi avaliada de acordo com o método descrito por Kitto (1969), em meio de incubação contendo 10 mM de rotenona, 0,2% de Triton X-100, 0,15 mM de NADH e 100 mM tampão de fosfato de potássio, pH 7,4, a 37 °C. A reação foi iniciada após a adição de oxaloacetato e o consumo de NADH foi acompanhado através da redução da absorbância em 340 nm durante 3 a 5 minutos a 37°C. A atividade foi expressa em nmol/min x mg de proteína.

#### 3.6.3 Atividade da succinato desidrogenase

A atividade da enzima succinato desidrogenase foi determinada de acordo com o método descrito por Fischer et al. (1985), em meio de incubação contendo tampão fosfato de potássio 62,4 mM pH 7,4, succinato de sódio 250 mM e dicloroindofenol (DCIP) 9 µM, foi

adicionada amostra contendo cerca de 80 a 140 µg de proteína. Os sistemas foram pré-incubados por 20 minutos a 30°C em banho-maria e, após, foram adicionados azida sódica 100 mM, rotenona 2 mM, metassulfato de fenazina 1 mM e DCIP 42 µM. A redução do DCIP foi determinada em 600 nm durante 5 minutos a 25°C (Fischer et al., 1985). A atividade foi expressa em nmol/min x mg de proteína.

#### **3.6.4 Atividade da creatina quinase**

A atividade da enzima creatina quinase foi determinada de acordo com o método descrito por Hughes (1962), em meio de incubação contendo 0,625 mM de lauril maltosídeo, 60 mM Trizma base-HCl, pH 7,5, 7 mM de fosfocreatina, 9 mM de sulfato de magnésio (MgSO<sub>4</sub>) e cerca de 0.4-1.2 µg de proteína em um volume final de 100 µL. Após 15 minutos de pré-incubação a 37 °C, a reação foi iniciada pela adição de 3,2 mmol de ADP (adenosina difosfato). A reação foi parada após 10 minutos através da adição de 1 µmol de ácido p-hidroximercuriobenzóico. A creatina formada foi mensurada de acordo com o método colorimétrico após adição de 100 µL de 2% α-naftol e 100 µL de 0,05% de diacetil em um volume final de 1 ml e após 20 minutos, as reações foram lidas no espectrofotômetro a 540 nm. Os resultados foram expressos como nmol/min x mg de proteína.

#### **3.6.5 Atividade do complexo I**

A atividade do complexo I foi avaliada pelo método descrito por Cassina & Radi (1996) pela taxa de NADH-dependente da redução do ferricianeto a 420 nm. A atividade foi expressa em nmol/min x mg de proteína.

#### **3.6.6 Atividade do complexo II**

A atividade do complexo II foi medida pelo método descrito por Fischer et al. (1985), onde a diminuição da absorbância do 2,6-DCIP em 600 nm foi usada para o cálculo da atividade do complexo II. A atividade foi expressa em nmol/min x mg de proteína.

### **3.6.7 Atividade do complexo II-III**

A atividade do complexo II-III foi determinada de acordo com Fischer et al. (1985) e foi baseada na redução do citocromo c acompanhada por espectrofotometria a 550 nm a 37°C. A reação foi iniciada pela adição de decilubiquinol e o aumento na absorbância em 550 nm durante 3 minutos a 37°C, devido à redução do citocromo c, foi acompanhado. Após 3 minutos foi acrescentada antimicina A (3 µg/mL) e o valor da absorbância foi acompanhado durante outros 3 minutos. A atividade do complexo II-III foi determinada como atividade sensível à antimicina. A atividade foi expressa em nmol/min x mg de proteína.

### **3.6.8 Atividade do complexo IV**

A atividade do complexo IV foi determinada de acordo com Rustin et al. (1994), e foi calculada pela diminuição do valor da absorbância causada pela oxidação do citocromo c reduzido, medido em 550 nm. A atividade foi expressa em nmol/min x mg de proteína.

## **3.7 PARÂMETROS DE DANO OXIDATIVO E DEFESA ANTIOXIDANTE**

### **3.7.1 Determinação de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico)**

O índice de peroxidação lipídica foi verificado através da formação de TBARS durante uma reação de aquecimento do ácido tiobarbitúrico (TBA) como descrito por Draper & Hadley (1990). Resumidamente, as amostras foram misturadas com 1 mL de ácido tricloroacético 10% e 1 mL de TBA 0,67%. Posteriormente foram aquecidos em banho-maria por 30 minutos. Nível de TBARS foram determinados pela absorbância a 532 nm usando 1,1,3,3 tetrametoxipropano como um padrão externo. Os resultados foram expressos como TBARS nmol/mg proteína.

### **3.7.2 Determinação de carbonilação de proteínas**

A carbonilação de proteínas foi medida pela determinação de grupos carbonil baseados na reação com dinitrofenilhidrazina (DNPH), previamente descrito por Levine et al. (1990). Proteínas foram precipitadas pela adição de 20% ácido tricloroacético e reagiu com

DNPH. O conteúdo de carbonil foi determinado espectrofotometricamente em  $\lambda=370$  nm considerando um coeficiente de absorvidade molar de 22.0000. Os resultados foram expressos como conteúdo de carbonil nmol/mg proteína  $\times 10^{-12}$ .

### **3.7.3 Atividade da SOD**

Atividade da SOD foi determinada medindo-se a inibição da auto-oxidação da adrenalina como absorbância a 480nm, conforme descrito anteriormente por Bannister & Calabrese (1987), e os resultados foram expressos em unidade/mg proteína.

### **3.7.4 Atividade da CAT**

Atividade da CAT foi medida pela taxa de redução na absorbância do peróxido de hidrogênio a 240 nm (Aebi, 1984), e os resultados foram expressos em unidade/mg proteína.

## **3.8 AVALIAÇÃO DE DANO AO DNA**

### **3.8.1 Ensaio cometa**

Os níveis de frequência de dano (FD) e índice de dano (ID) ao DNA foram avaliados utilizando-se o ensaio cometa no qual foi realizado sob condições alcalinas, conforme descrito por Singh et al. (1988), com algumas modificações sugeridas por Tice et al. (2000). As amostras de córtex posterior foram dissecadas e imersas em tampão fosfato (PBS) refrigerado. Em seguida elas foram individualmente homogeneizadas com o auxílio de uma seringa, a fim de obter uma suspensão celular. As células obtidas da dissociação de tecidos (alíquotas de 25  $\mu$ L) foram embebidas em agarose de baixo ponto de fusão (0.75%, w/v, 95  $\mu$ L ou 75  $\mu$ L, respectivamente) e a mistura foi adicionada a uma lâmina de microscópio pré-coberta com agarose (1,5%) de ponto de fusão normal, cobrindo posteriormente com uma lamínula e levando, então, à geladeira por aproximadamente 5 minutos a 4°C para solidificação. Logo após, as lamínulas foram cuidadosamente retiradas 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 Dimetilsulfóxido - 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 (300 mM 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 amarela. Posteriormente as lâminas foram neutralizadas com 0,4M Tris (pH 7,5) e, ao final, o DNA foi corado com nitrato de prata (Villela et al., 2006).

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, 2004). Desta forma, tem-se um Índice de danos para cada grupo variando de zero (100 X 0 = 0; 100 células observadas completamente sem danos) a 400 (100 X 4 = 400; 100 células observadas com dano máximo). Calculou-se a frequência de danos (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, 2004). 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.

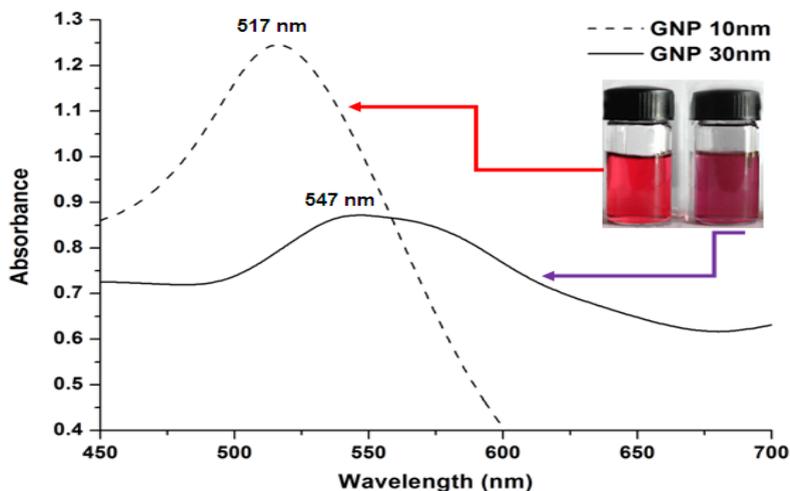
### 3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística entre dois grupos foi realizada com o *software* Bioestat 5.0. Os dados foram expressos em media  $\pm$  desvio padrão. A normalidade das variáveis foi avaliada usando o teste *Kolmogorov-Smirnov* e o teste t de *Student* foi usado para comparar os grupos. Ainda, a análise estatística utilizada para comparar três grupos foi realizada (com o programa Statistical Package for the Social Science (SPSS) versão 17.0) usando a análise de variância de uma via (ANOVA). Quando ANOVA demonstrava diferença significativa ( $P<0,05$ ), análises *post hoc* foram realizadas com o teste de Tukey.

## 4 RESULTADOS

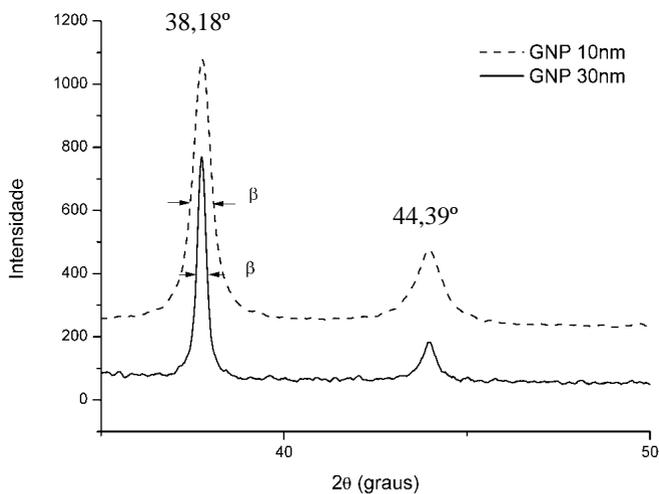
### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS GNP

Quantidades suficientes de GNP-10 e GNP-30 foram sintetizadas e caracterizadas conforme a metodologia descrita. A figura 9 corresponde aos espectros eletrônicos de soluções de GNP-10 e GNP-30 e revelam a presença de uma banda com absorção máxima a 517 nm e a 547 nm, respectivamente. A inserção na figura 9 corresponde colorações das duas soluções de GNP.



**Fig. 9.** Espectros eletrônicos para soluções aquosas de GNP-10 e GNP-30. GNP-10 (---) e GNP-30 (—), bandas a 517 e 547 nm, respectivamente. A inserção corresponde as duas solução de GNP.

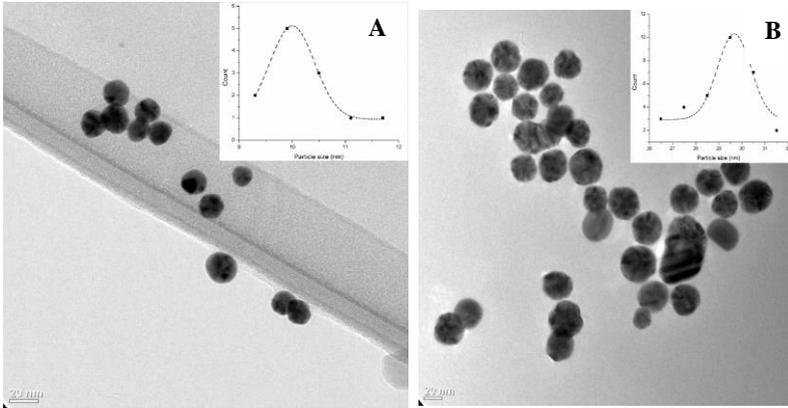
Os difratogramas de raios-X apresentados na Figura 10 mostram reflexões em  $38,18^\circ$  e  $44,39^\circ$  típicos de ouro metálico. Os diâmetros médios das nanopartículas foram determinados com base no sinal de maior intensidade, ou seja,  $2\Theta = 38,18^\circ$  e empregando a equação de Scherrer. Os valores obtidos foram de 10 e 30 nm, conforme esperado, sendo que estes foram confirmados pelas imagens de TEM, que mostrou predominantemente GNP esféricas.



**Fig. 10.** Padrão de DRX (Difratograma) de GNP-10 (reflexões a 38,18°) e GNP-30 (reflexões a 44,39°). GNP-10 (---) e GNP-30 (—). Cu K $\alpha$  radiação ( $\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$ , 30 kV, 30 mA). Taxa de leitura 2°/min.

O teor de ouro em solução, determinado por espectroscopia de absorção atômica para ambas as soluções foram de 70 mg L<sup>-1</sup>. As medidas de potencial zeta revelaram valores de -30 mV e -35 mV para GNP-10 e GNP-30, respectivamente.

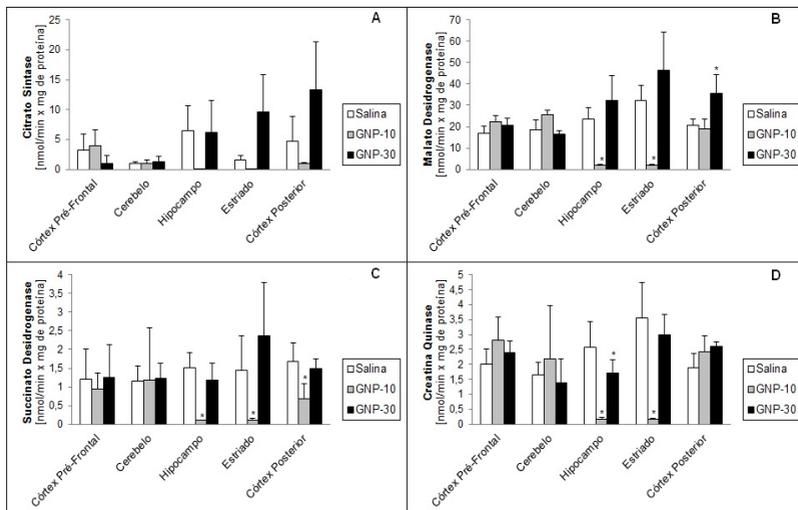
A figura 11 ilustra duas micrografias obtidas por microscopia de transmissão eletrônica (TEM) das nanopartículas de ouro. As inserções (histogramas) correspondem às respectivas curvas de distribuição de tamanho de partículas.



**Fig. 11.** Microscopia eletrônica de transmissão de GNP-10 e GNP-30. Nanopartículas de ouro esféricas preparadas em solução aquosa. Diâmetro 10 nm (A) e diâmetro 30 nm (B). A barra de escala equivale a 20 nm. As inserções (histogramas) correspondem às respectivas curvas de distribuição de tamanho de partículas.

#### 4.2 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DE GNP NA ATIVIDADE DAS ENZIMAS DO CICLO DE KREBS E CREATINA QUINASE

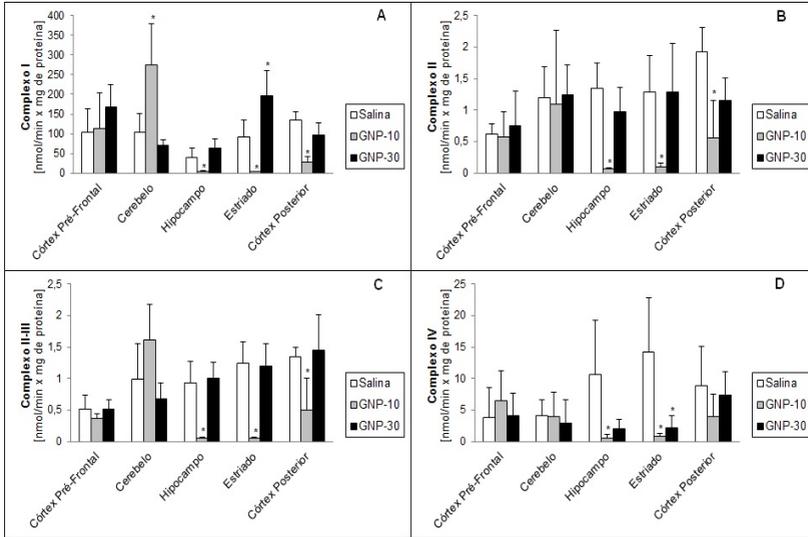
Os resultados da avaliação da atividade das enzimas citrato sintase, malato desidrogenase, succinato desidrogenase e creatina quinase mostraram que após administração aguda de GNP-10 e GNP-30 não houve alteração na atividade da citrato sintase (fig. 12a). No entanto, a atividade da malato desidrogenase (fig. 12b) foi inibida por GNP-10 no hipocampo e estriado e ativada por GNP-30 no córtex posterior. A atividade da succinato desidrogenase (fig. 12c) foi inibida por GNP-10 no hipocampo, estriado e córtex posterior. A atividade da creatina quinase (fig. 12d) foi inibida por GNP-10 no hipocampo e estriado e inibida por GNP-30 no hipocampo.



**Fig. 12.** Atividade da citrato sintase, malato desidrogenase, succinato desidrogenase e creatina quinase após administração aguda de GNP-10 e GNP-30. Atividade da citrato sintase (A), malato desidrogenase (B), succinato desidrogenase (C) e creatina quinase (D) no córtex pré-frontal, cerebelo, hipocampo, estriado e córtex posterior de ratos. Os dados foram avaliados pela análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido pelo teste de Tukey quando o F foi significativo. Os valores são expressos como nmol/min x mg de proteína, média  $\pm$  desvio padrão. (n=6) \*p<0,05 *versus* grupo controle.

#### 4.3 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DE GNP NA ATIVIDADE DOS COMPLEXOS DA CADEIA RESPIRATÓRIA MITOCONDRIAL

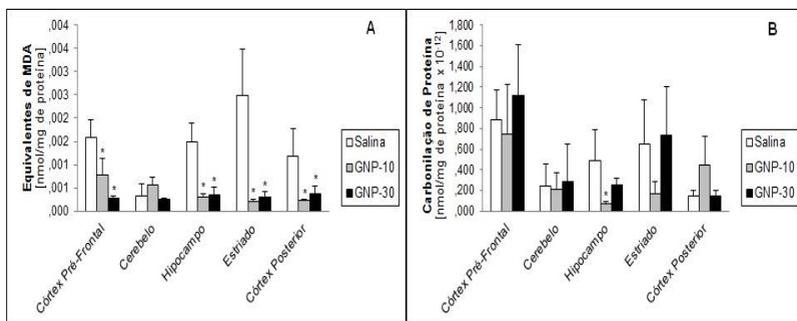
Os resultados da avaliação da atividade dos complexos I, II, II-III e IV da cadeia respiratória mitocondrial, conforme figura 13, mostraram que a atividade do complexo I (fig. 13a) foi ativada por GNP-10 no cerebelo e por GNP-30 no estriado. Em contraste, GNP-10 inibiu a atividade do complexo I no hipocampo, estriado e córtex posterior. A atividade do complexo II (fig. 13b) e II-III (fig. 13c) foram inibidas por GNP-10 no hipocampo, estriado e córtex posterior. A atividade do complexo IV (fig. 13d) foi inibida por GNP-10 no hipocampo e estriado e por GNP-30 no estriado.



**Fig. 13.** Atividade dos complexos mitocondriais após administração aguda de GNP-10 e GNP-30. Atividade do complexo I (A), II (B), II-III (C) e IV (D) da cadeia transportadora de elétrons no córtex pré-frontal, cerebelo, hipocampo, estriado e córtex posterior de ratos. Os dados foram avaliados pela análise de variância de uma via (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey quando o F foi significativo. Os valores são expressos como nmol/min x mg de proteína, média  $\pm$  desvio padrão. (n=6) \* *versus* grupo controle;  $p < 0,05$ .

#### 4.4 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DE GNP EM PARÂMETROS DE DANO OXIDATIVO

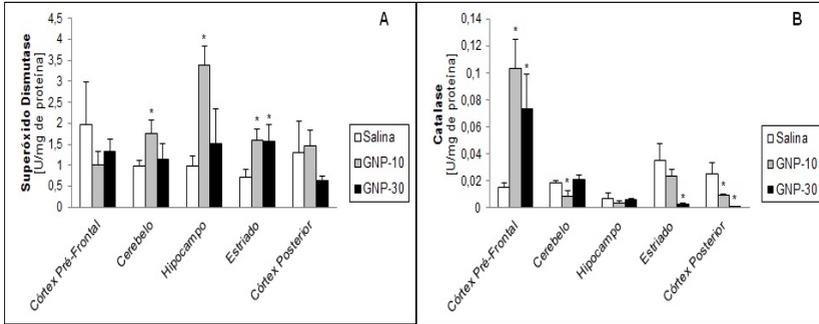
Nos resultados encontrados para TBARS e carbonilação de proteínas, foi observado que a administração aguda de GNP-10 e GNP-30 diminuiu os níveis de TBARS no córtex pré-frontal, hipocampo, estriado e córtex posterior, mas não alterou no cerebelo (fig. 14a). Além disso, os níveis de carbonilação de proteínas diminuíram no hipocampo após administração aguda de GNP-10 (fig. 14b) quando comparado ao grupo controle.



**Fig. 14.** Níveis de TBARS e carbonilação de proteínas após administração aguda de GNP-10 e GNP-30. Níveis de TBARS (A) e carbonilação de proteínas (B) no córtex pré-frontal, cerebello, hipocampo, estriado e córtex posterior de ratos. Os dados foram avaliados pela análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido pelo teste de Tukey quando o F foi significativo. Os valores são expressos como nmol / mg de proteína (A) e nmol / mg de proteína x 10<sup>-12</sup> (B), média ± desvio padrão. (n=6) \*p<0,05 versus grupo controle.

#### 4.5 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DE GNP NA ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES

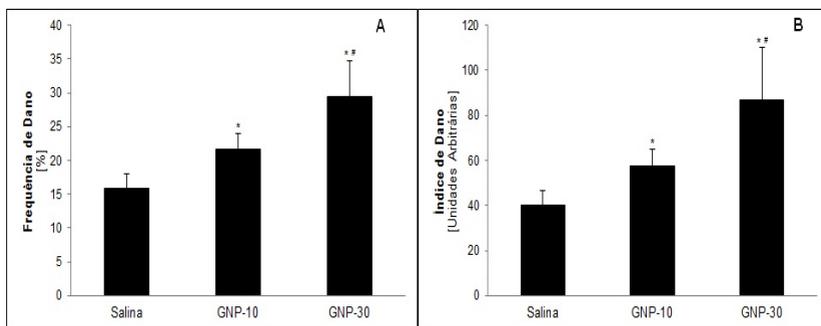
Os resultados da atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT, mostraram que a administração aguda de GNP-10 aumentou a atividade da SOD no cerebello, hipocampo e estriado, bem como a administração de GNP-30 aumentou a atividade da SOD no estriado quando comparado ao grupo controle (fig. 15a). Porém, a administração aguda de GNP-10 diminuiu a atividade da CAT no cerebello e córtex posterior, mas aumentou no córtex pré-frontal quando comparado ao grupo controle. Além disso, GNP-30 aumentou a atividade da CAT no córtex pré-frontal e inibiu no estriado e córtex posterior (fig. 15b).



**Fig. 15.** Atividade da SOD e CAT após administração aguda de GNP-10 e GNP-30. Atividade da SOD (A) e CAT (B) no córtex pré-frontal, cerebello, hipocampo, estriado e córtex posterior de ratos. Os dados foram avaliados pela análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido pelo teste de Tukey quando o F foi significativo. Os valores são expressos como U/mg de proteína, média  $\pm$  desvio padrão. (n=6) \* $p < 0,05$  versus grupo controle.

#### 4.6 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DE GNP EM PARÂMETROS DE DANO AO DNA

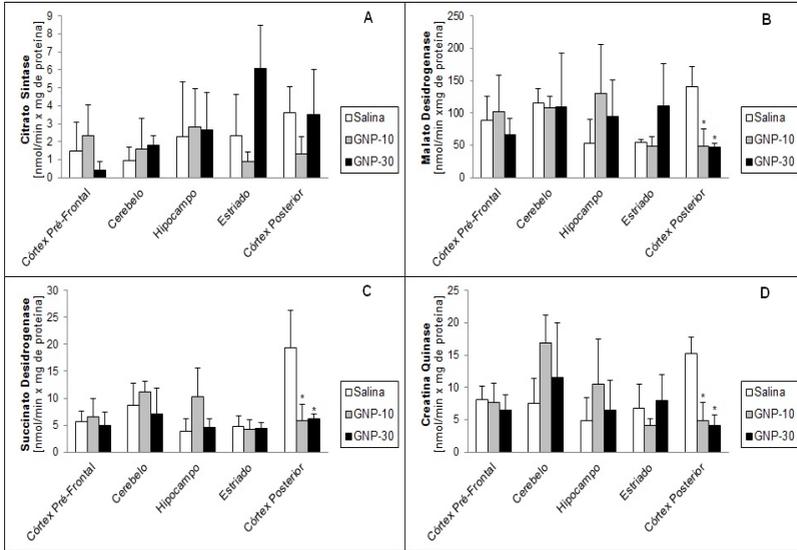
Como mostrado na figura 16, observa-se que a administração aguda de GNP-10 e GNP-30 apresentou altos níveis de dano ao DNA no córtex posterior em ambos os parâmetros de ensaio cometa, frequência de dano (fig. 16a) e índice de dano (fig. 16b) quando comparado ao grupo controle, bem como a administração aguda de GNP-30 apresentou aumento significativo nos níveis de frequência de dano e índice de dano quando comparado ao grupo que recebeu GNP-10.



**Fig. 16.** Frequência e índice de dano ao DNA após administração aguda de GNP-10 e GNP-30. Frequência de dano no DNA (A) e índice de dano no DNA (B) no córtex posterior de ratos. Os dados foram avaliados pela análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido pelo teste de Tukey quando o F foi significativo. Os valores são expressos em percentual (A) e em unidades arbitrárias (B), média  $\pm$  desvio padrão. (n=6) \* $p < 0,05$  versus grupo controle; # $p < 0,05$  versus grupo GNP-10.

#### 4.7 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE GNP NA ATIVIDADE DAS ENZIMAS DO CICLO DE KREBS E CREATINA QUINASE

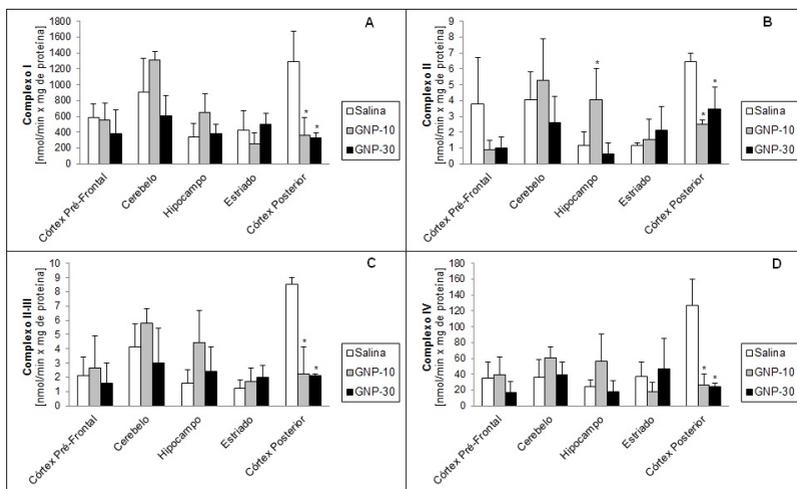
Nos resultados da avaliação da atividade das enzimas citrato sintase, malato desidrogenase, succinato desidrogenase e creatina quinase, foram observados que a administração crônica de GNP não alterou a atividade da citrato sintase (fig. 17a). Entretanto, a atividade da malato desidrogenase (fig. 17b), succinato desidrogenase (fig. 17c), creatina quinase (fig. 17d), foram inibidas por GNP-10 e GNP-30 no córtex posterior.



**Fig. 17.** Atividade da citrato sintase, malato desidrogenase, succinato desidrogenase e creatina quinase após administração crônica de GNP-10 e GNP-30. Atividade da citrato sintase (A), malato desidrogenase (B), succinato desidrogenase (C), creatina quinase (D) no córtex pré-frontal, cerebello, hipocampo, estriado e córtex posterior de ratos. Os dados foram avaliados pela análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido pelo teste de Tukey quando o F foi significativo. Os valores são expressos como nmol/min x mg de proteína, média  $\pm$  desvio padrão. (n=6) \*p<0,05 versus grupo controle.

#### 4.8 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE GNP NA ATIVIDADE DOS COMPLEXOS DA CADEIA RESPIRATÓRIA MITOCONDRIAL

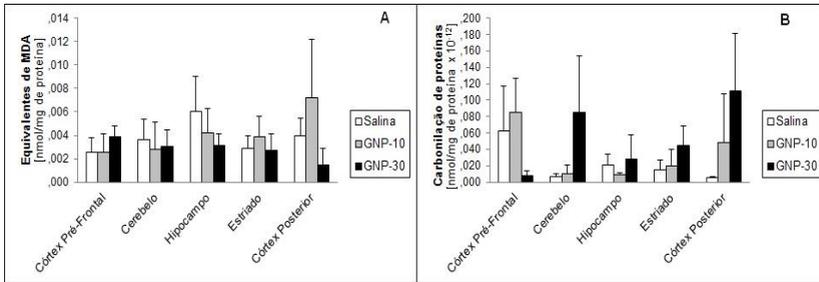
Os resultados da avaliação da atividade dos complexos I, II, II-III e IV da cadeia respiratória mitocondrial, conforme figura 18, mostraram que a administração crônica de GNP-10 e GNP-30 inibiu a atividade do complexo I (fig. 18a), II (fig. 18b), II-III (fig. 18c) e IV (fig. 18d) no córtex posterior. Porém, houve uma ativação na atividade do complexo II por GNP-10 no hipocampo (fig. 18b).



**Fig. 18.** Atividade dos complexos mitocondriais após administração crônica de GNP-10 e GNP-30. Atividade do complexo I (A), II (B), II-III (C) e IV (D) da cadeia transportadora de elétrons no córtex pré-frontal, cerebelo, hipocampo, estriado e córtex posterior de ratos. Os dados foram avaliados pela análise de variância de uma via (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey quando o F foi significativo. Os valores são expressos como nmol/min x mg de proteína, média  $\pm$  desvio padrão. (n=6) \* $p < 0,05$  versus grupo controle.

#### 4.9 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE GNP EM PARÂMETROS DE DANO OXIDATIVO

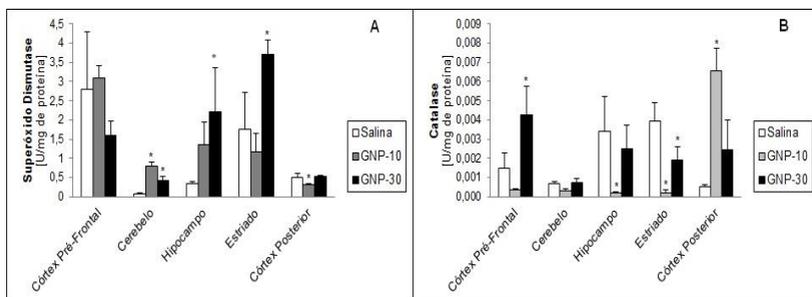
Nos resultados da avaliação de dano oxidativo, nenhuma alteração foi observada nos níveis de TBARS e carbonilação de proteínas após administração crônica de GNP-10 e GNP-30 conforme podem ser vistos nas figuras 19a e 19b, respectivamente.



**Fig. 19.** Níveis de TBARS e carbonilação de proteínas após administração crônica de GNP-10 e GNP-30. TBARS (A) e carbonilação de proteínas (B) no córtex pré-frontal, cerebello, hipocampo, estriado e córtex posterior de ratos. Os dados foram avaliados pela análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido pelo teste de Tukey quando o F foi significativo. Os valores são expressos como nmol / mg de proteína (A) e nmol / mg de proteína  $\times 10^{-12}$ (B), média  $\pm$  desvio padrão. (n=6) \*p<0,05 *versus* grupo controle.

#### 4.10 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE GNP NA ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES

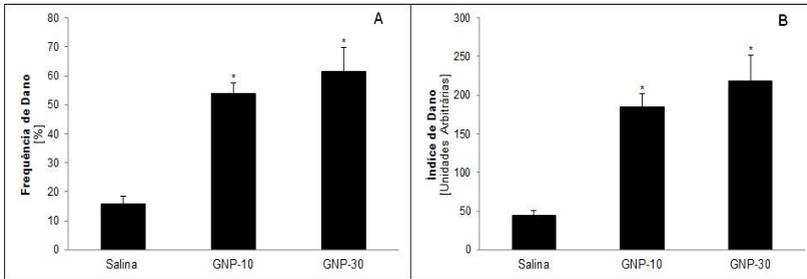
Os resultados da atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT mostraram que a administração crônica de GNP-10 aumentou a atividade da SOD no cerebello e diminuiu no córtex posterior quando comparado ao grupo controle. Ainda, GNP-30 aumentou a atividade da SOD no cerebello, hipocampo e estriado quando comparado ao grupo salina (fig. 20a). A atividade da CAT foi aumentada no córtex posterior e diminuiu no hipocampo e estriado por GNP-10 quando comparado ao controle. E, finalmente, a atividade da CAT foi aumentada no cortex pré-frontal e diminuída no estriado por GNP-30 quando comparado ao controle (fig. 20b).



**Fig. 20.** Atividade da SOD e CAT após administração crônica de GNP-10 e GNP-30. Atividade da SOD (A) e CAT (B) no córtex pré-frontal, cerebelo, hipocampo, estriado e córtex posterior de ratos. Os dados foram avaliados pela análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido pelo teste de Tukey quando o F foi significativo. Os valores são expressos como U/mg de proteína, média  $\pm$  desvio padrão. (n=6) \* $p < 0,05$  versus grupo controle.

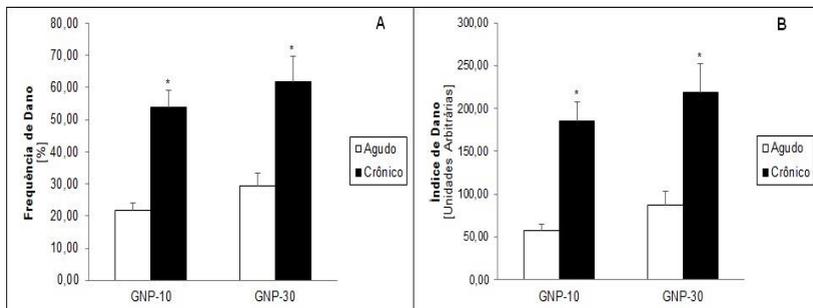
#### 4.11 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE GNP EM PARÂMETROS DE DANO AO DNA

Após a administração crônica de GNP-10 e GNP-30 foi observado altos níveis de dano ao DNA em córtex posterior em ambos os parâmetros de ensaio cometa avaliados, frequência de dano (fig. 21a) e índice de dano (fig. 21b) quando comparado ao grupo controle. No entanto, não houve diferença significativa entre os grupos GNP-10 e GNP-30.



**Fig. 21.** Frequência e índice de dano ao DNA após administração crônica de GNP-10 e GNP-30. Frequência de dano no DNA (A) e índice de dano no DNA (B) no córtex posterior de ratos. Os dados foram avaliados pela análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido pelo teste de Tukey quando o F foi significativo. Os valores são expressos em percentual (A) e em unidades arbitrárias (B), média  $\pm$  desvio padrão. (n=6) \* $p < 0,05$  versus grupo controle.

Ainda, pode-se observar que houve aumento significativo nos níveis de frequência de dano (fig. 22a) e índice de dano (fig. 22b) no córtex posterior de ratos submetidos a administração crônica de GNP-10 e GNP-30, quando comparado à administração aguda.



**Fig. 22.** Correlação dos níveis de frequência de dano ao DNA e índice de dano ao DNA após administração aguda e crônica de GNP-10 e GNP-30. Frequência de dano no DNA (A) e índice de dano no DNA (B) no córtex posterior de ratos. Os dados foram avaliados usando o teste t de Student. Os valores são expressos em percentual (A) e em unidades arbitrárias (B), média  $\pm$  desvio padrão. (n=6) \* $p < 0,05$  versus grupo controle.

**Tabela 1:** Esquema representativo dos resultados.

	Córtex Pre Frontal				Cerebelo				Hipocampo				Estríado				Córtex Posterior																							
	GNP-10		GNP-30		GNP-10		GNP-30		GNP-10		GNP-30		GNP-10		GNP-30		GNP-10		GNP-30																					
	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C																				
<b>DANO DNA</b>	Frequência de Dano																				▲	▲	▲	▲																
	Índice de Dano																				▲	▲	▲	▲																
<b>METABOLISMO ENERGÉTICO</b>	Citrito Sintase																																							
	Malato Desidrogenase																										▽											▽	▲	▽
	Succinato Desidrogenase																										▽											▽	▽	▽
	Creatina Quinase																										▽	▽											▽	▽
	Complexo I																								▲														▽	▽
	Complexo II																												▲										▽	▽
	Complexo II-III																																						▽	▽
	Complexo IV																																						▽	▽
<b>ESTRESSE OXIDATIVO</b>	TBARS																				▽																		▽	
	Carbonilação de proteínas																																							▽
	Superóxido Dismutase																								▲	▲			▲	▲			▲	▲					▽	
	Catalase																				▲		▲	▲	▽														▲	▽

**Legenda**

- ▲ Ativação (Administração Aguda)
- ▽ Inibição (Administração Aguda)
- ▲ Ativação (Administração Crônica)
- ▽ Inibição (Administração Crônica)

**Tabela 1.** Sumário das variações observadas para cada um dos marcadores avaliados após administração aguda e crônica de GNP-10 e GNP-30.

A tabela 1 sumariza todos os resultados observados neste estudo sendo que, de modo geral, a administração aguda e crônica de GNP-10 e GNP-30 causou inibição do metabolismo energético, diminuiu a peroxidação lipídica e a carbonilação de proteínas após administração aguda de GNP dos dois tamanhos, mas não houve alteração desses parâmetros pela administração crônica. Observamos ainda que houve alteração na atividade das enzimas antioxidante (SOD e CAT) bem como causou altos ID e FD ao DNA no córtex posterior de ratos após administração aguda e crônica de GNP-10 e GNP-30.

Ademais, observamos também que na administração aguda de GNP-10 causou inibição em maior número de estruturas cerebrais (hipocampo, estriado e córtex posterior) quando comparada a

administração crônica. Sendo que a administração crônica de ambas as soluções, GNP-10 e GNP-30 causaram inibição do metabolismo energético somente no córtex posterior.

Pode-se observar também, pelos resultados encontrados, que as GNP-10 e GNP-30 podem atravessar a barreira hemato-encefálica, resultando em um acúmulo no cérebro, principalmente no hipocampo, estriado e córtex posterior.

## 5 DISCUSSÃO

No presente estudo buscou-se sintetizar e caracterizar GNP nos tamanhos de 10 e 30 nm com intuito de avaliar seus efeitos sobre parâmetros bioquímicos em cérebro de ratos após administração aguda e crônica. Neste sentido, com base nos dados do presente trabalho, pode-se observar que os resultados de espectroscopia de UV-Vis, DRX assim como a análise de TEM corroboram com estudos anteriores, mostrando que os espectros eletrônicos e, conseqüentemente, as colorações das dispersões coloidais de GNP dependem da geometria e tamanho das partículas, visto que a coloração resulta da interação dos elétrons das superfícies das nanopartículas com a luz incidente (Philip, 2008; Alkilany & Murphy, 2010).

Com o aumento do tamanho das partículas a banda de SPR característica torna-se mais larga e desloca-se em direção ao vermelho, e os picos de DRX tornam-se mais estreitos (Link & El-Sayed, 1999; Chen et al., 2005). Neste sentido, a equação de Scherrer foi aplicada neste estudo, tomando como base o sinal mais intenso, isto é, o pico em ( $2\theta = 38,18^\circ$ ), correspondente ao plano cristalino (111) para calcular o diâmetro médio de partícula das dispersões de GNP-10 e GNP-30. Os espectros de DRX apresentaram ainda sinais em ( $2\theta = 44,39^\circ$ ), correspondente ao plano cristalino (200) e dois outros sinais (não mostrados na fig. 10) em ( $2\theta = 64,58^\circ$  e  $77,55^\circ$ ) correspondendo os planos cristalinos (220) e (311) respectivamente e sugerem uma estrutura de ouro metálico com face cúbica centrada. Por conseguinte, os espectros de DRX de GNP foram compatíveis com o espectro padrão do ouro metálico que apresentam sinais correspondente aos planos cristalinos (111, 200, 220 e 311) correspondendo a reflexão de Bragg (JCPDS number: 4-0784) (Yan et al., 2005; Singh et al., 2009; Aromal & Philip, 2012). A morfologia e o diâmetro médio das partículas foram confirmados por análise de TEM, uma ferramenta que auxilia na identificação do tamanho das nanopartículas, apresentando um formato esférico e diâmetros médios de 10 e 30 nm respectivamente. Este procedimento foi fundamental para assegurar que as GNP usadas neste estudo apresentaram sempre as mesmas dimensões, tornando, desta forma, aptas para serem utilizadas no estudo proposto.

Um detalhe importante é em relação a curva de distribuição de tamanho de partículas que foi efetuada a partir das determinações de diâmetro de um conjunto de partículas por TEM. Observa-se nas inserções nas figuras 11a e 11b que se trata de distribuições estreitas de

tamanhos. Por exemplo, as GNP-10 têm mínimo em 9 e máximo em 12 nm. As GNP-30 têm mínimo em 26,5 e máximo em 31,5 nm.

Em um próximo passo, avaliaram-se os efeitos das GNP-10 e GNP-30 sobre parâmetros bioquímicos em cérebro de ratos. Com base nisso, demonstrou-se que a administração aguda e crônica de GNP-10 e GNP-30 inibiu o metabolismo energético, alterou a formação de EROs, bem como a defesa antioxidante e causou dano ao DNA em cérebro de ratos adultos. Sabe-se que as GNP podem ser amplamente distribuídas no organismo, e que GNP 15-50 nm podem atravessar a barreira hemato-encefálica, resultando em um acúmulo no cérebro (Sonavan et al., 2008). Portanto, a biossegurança do ouro metálico é bem conhecida, e é usada *in vivo* desde 1950 (Zhang et al., 2010), porém, é essencial entender a interação do GNP com órgãos vitais, tal como o cérebro.

Neste cenário, a toxicidade *in vivo* de nanopartículas deve ser determinada por diversos parâmetros, tais como: dose, via de administração, metabolismo, excreção, resposta imunológica, bem como composição química, tamanho, forma, agregação e superfície de revestimento dos nanomateriais (Zhang et al., 2010). Uma das preocupações da ciência no desenvolvimento tecnológico é que as nanopartículas podem apresentar tanto um potencial efeito funcional, bem como tóxico nas células neuronais devido a sua capacidade de atravessar as membranas biológicas (Brooking et al., 2001). Assim, o aumento da reatividade da superfície implica em nanopartículas que apresentem um aumento da atividade biológica podendo este efeito ser útil para que as mesmas penetrem nas células e entreguem fármacos (Siddiqi et al., 2012). Por outro lado, o ouro em macroescala é geralmente considerado química e biologicamente inerte (Hammer & Norskov, 1995). Por isso os efeitos tóxicos de nanopartículas podem estar relacionados com fatores biótico ou abióticos com tamanho e forma, uma vez que, quanto menor a partícula, maior a área superficial específica e, portanto, maior a concentração relativa de íons quimiodissolvidos e maior a interação com a membrana celular, ou mais fácil sua internalização pela célula através da membrana sendo que essa internalização pode ser facilitada pela oxidação da superfície (Lapresta-Fernández et al., 2012). A luz dos conhecimentos atuais, os efeitos de toxicidade causadas por GNP bem como seus efeitos adversos estão atribuídos a sua interação com a membrana celular, sendo possível que as nanopartículas entrem diretamente nas células, ou mesmo no núcleo, danificando-o ou induzindo disfunção mitocondrial, bem como formação de EROs o que pode, em seguida, causar dano ao DNA (Auffan et al., 2009).

Neste estudo, foi observado que a atividade das enzimas malato e succinato desidrogenase do ciclo de Krebs, apresentaram inibição após administração aguda e crônica de GNP-10 e GNP-30. Isso pode ter levado a uma diminuição no transporte de elétrons para os complexos I e II da cadeia respiratória mitocondrial, o que poderia explicar a causada da inibição do metabolismo energético encontrado.

Ainda observou-se que a inibição do metabolismo energético apresentou-se mais intensa após a administração aguda no hipocampo, estriado e córtex posterior, quando comparada com a administração crônica, onde o metabolismo energético permaneceu inibido apenas no córtex posterior.

Estudos conduzido por Chen et al. (2010), mostrou que a administração de GNP 17 nm causa prejuízo no aprendizado e na formação e consolidação da memória em camundongos. A presença de partículas metálicas, tais como o GNP, em neurônios e células dendríticas pode afetar a neurotransmissão hipocampal e assim interferir na memória e no aprendizado. No entanto, a administração de GNP 37 nm não causou dano nesta região cerebral (Chen et al., 2010). Um estudo de Siddiqi et al. (2012), mostrou que GNP 20 nm causou diminuição nos níveis de neurotransmissores, tais como dopamina e serotonina. O estriado é uma das fontes mais ricas de sinapses dopaminérgicas, e a dopamina é um importante regulador da função estriatal (Dougherty et al., 1999). Assim, o dano a memória e aprendizado causado por GNP pode estar correlacionado com neurotransmissão dopaminérgica e serotoninérgica em cérebro de camundongos (Chen et al., 2010), visto que, lesões estriatais tem mostrado causar hiperatividade, prejuízo na memória e inibição da resposta a tarefas em modelos animais (Alexander et al., 1986). Com base nisso, sugere-se que o prejuízo energético encontrado no hipocampo e estriado, no presente estudo, pode estar relacionado com as alterações encontradas na neurotransmissão dopaminérgica e serotoninérgica após administração de GNP.

Além disso, um estudo de Sousa et al. (2010), já havia mostrado que a GNP é primeiramente acumulada no hipocampo, tálamo, hipotálamo e córtex cerebral, o que pode ter contribuído para a inibição do metabolismo energético visto neste trabalho. No entanto, neste estudo observou-se que a administração aguda de GNP inibiu o metabolismo energético em mais regiões cerebrais quando comparado a administração crônica. A razão para esta diferença é desconhecida, mas pode estar relacionada com dessensibilização de receptores devido a repetidas administrações de GNP. Por exemplo, estudo de Nestler

(2005), mostrou que estimulações excessivas de receptores dopaminérgicos durante a exposição à psicoestimulantes induzem várias mudanças moleculares no sistema mesolímbico dopaminérgico, o que pode contribuir para uma adaptação.

Além disso, pode-se observar que o metabolismo energético foi inibido após a administração aguda apenas por GNP-10, enquanto a administração crônica causou inibição do metabolismo por ambas as GNP administradas. Este resultado pode ser devido a passagem tamanho-dependente de nanopartículas através da barreira hematoencefálica (Sonavane et al., 2008). Ainda, considerando que a inibição do metabolismo após a administração crônica de GNP-10 e GNP-30 se deu apenas no córtex posterior, sugere-se que não houve adaptação de receptores nesta região cerebral, bem como é possível que tenha ocorrido um acúmulo de GNP no córtex posterior após repetidas administrações, contribuindo para este achado.

Ainda, Sousa et al. (2010), avaliaram a distribuição de GNP no cérebro de camundongos e acharam que o pico de concentração ocorre entre 19 e 24 horas após a administração. Portanto, sugere-se que a maior inibição do metabolismo energético ocorreu após a administração aguda de GNP devido ao pico de concentração das nanopartículas no SNC, após uma primeira exposição, visto que no hipocampo e estriado, possivelmente, ocorreu adaptação após repetidas administrações. Ou ainda, a administração aguda de GNP, no primeiro momento sofre um “impacto” e depois de repetidas administrações pode ter ocorrido uma tentativa de proteção e/ou neutralização por parte do sistema imunitário pelos mecanismos de defesas que tentaram reconhecer e neutralizar o efeito adverso das GNP. Estudos de Bastus et al. (2009), mostraram que a conjugação de peptídeos na superfície de GNP podem melhorar a resposta imune. No entanto, no presente estudo, não podemos afirmar que isso possa ter ocorrido, para isso precisaríamos avaliar imunologicamente esses mecanismos de defesa e resposta.

O cérebro é um dos órgãos metabolicamente mais ativos e, este tecido, rico em mitocôndrias, consome em torno de 20% do total de O<sub>2</sub> disponível para o organismo (Dickinson, 1996). Tendo em vista que a fosforilação oxidativa é responsável pela quase totalidade do ATP produzido no SNC, a regulação da respiração mitocondrial se torna essencial para o correto metabolismo energético cerebral (Erecinska et al., 1994). Por outro lado, a mitocôndria é a principal fonte geradora de EROs em condições fisiológicas (Chance et al., 1979; Sipos et al., 2003). Esta produção basal de EROs é essencial para diversos processos celulares, incluindo fagocitoses e sinalização celular (Del Maestro et al.,

1981; Shapiro, 2003). No entanto, a produção ou acúmulo de EROs é aumentada quando a função da cadeia transportadora de elétrons é prejudicada por mitotoxinas exógenas ou endógenas (Nicholls & Budd, 2000; Sipos et al., 2003; Okayama, 2005; Di Filippo et al., 2006).

Neste estudo foi observada diminuição nos níveis de TBARS e carbonilação de proteínas, bem como aumento na atividade da SOD e inibição na atividade da CAT em estruturas cerebrais após a administração aguda de GNP. Além disso, não ocorreu alteração nos níveis de TBARS e carbonilação de proteínas após administração crônica de GNP, porém a atividade da SOD permaneceu principalmente, ativada e a atividade da CAT inibida. Sabe-se que o estresse oxidativo é causado por um desequilíbrio entre a geração e eliminação das EROs (Emerit et al., 2004). Além disso, estas espécies formadas podem exercer efeito tóxico sobre as células e o organismo (Halliwell, 1994; Peres et al., 2000). Assim, em condições de excesso na produção ou defesa comprometida, as EROs podem reagir com lipídios, proteínas e DNA, causando dano a estes substratos (Maes et al., 2011).

Estudo de Siddiqi et al. (2012), mostrou que GNP 20 nm causa estresse oxidativo devido ao aumento na peroxidação lipídica em cérebro de ratos. Sendo assim, o estresse oxidativo tem sido identificado como um mecanismo de toxicidade das nanopartículas (Li et al., 2008) e um efeito indesejado do GNP poderia incluir o aumento na geração de EROs (Siddiqi et al., 2012). No entanto, no presente estudo foi observado diminuição no dano causado por EROs. Com base nisso, é conhecido que o sistema de fosforilação oxidativa mitocondrial gera EROs, principalmente pelos complexos I e III da cadeia transportadora de elétrons (Adam-Vizi, 2005; Navarro & Boveris, 2007). Neste sentido, estudo de Pan et al. (2009), mostrou que partículas menores (1,4 nm de diâmetro) induzem disfunção mitocondrial em linhagens de células. Entretanto, sugere-se que os tamanhos de 10 e 30 nm não causem danos a lipídios e proteínas devido a inibição no transporte de elétrons, consequentemente, menos elétrons estão disponíveis para ligarem-se ao oxigênio e, assim, formar EROs. Como consequência disso, menor peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas encontrados (TBARS Carbonil).

Desta forma, este resultado parece ser consequência de um mecanismo tóxico induzido por GNP, onde a cadeia transportadora de elétrons pode estar comprometida. Além disso, acompanha este fato o aumento na atividade da SOD e inibição na atividade da CAT, o que indica uma tentativa de reparo para tal toxicidade induzida por GNP. Entretanto, a explicação para estes resultados permanece obscura.

O sistema de defesa antioxidante tem a função de inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação deletéria dos radicais livres ou das EROs. Tais ações podem ser alcançadas por meio de diferentes mecanismos de ação, tais como impedindo a formação das EROs (sistemas de prevenção), impedindo a ação desses (sistemas varredores) ou, ainda, favorecendo o reparo e a reconstituição das estruturas biológicas lesadas (sistemas de reparo) (Clarkson & Thompson, 2000; Koury & Donangelo, 2003). Usualmente, esse sistema é dividido em enzimático e não-enzimático. No sistema de defesa enzimático as enzimas agem por meio de mecanismos de prevenção, impedindo e/ou controlando a formação de radicais livres e EROs, envolvidos com a iniciação das reações em cadeia que culminam com propagação e amplificação do processo e, conseqüentemente, com a ocorrência de danos oxidativos (Ferreira & Matsubara, 1997; Schneider & Oliveira, 2004).

Neste estudo também se observou que a administração crônica de GNP não alterou os níveis de TBARS e carbonilação de proteínas. A reação para a discrepância deste estudo poderia estar relacionada à adaptação de receptores devido a repetidas exposições ou ainda devido a mecanismo de adaptação celular. Porém, as atividades da SOD e da CAT permaneceram alteradas. Outro ponto a considerar é que as alterações na defesa antioxidante não ocorreram similarmente nas estruturas cerebrais. Isto pode ser explicado pelo fato que o cérebro é a estrutura biológica mais complexa conhecida, formada por várias regiões que respondem de forma diferente, e em parte com diferentes tipos de neurônios. Além disso, dentro de uma população homogênea de células, há heterogeneidade em termos de características fisiológicas e metabólicas (Lai et al., 1977; Sims, 1991; Sonnewald et al., 1998).

Por outro lado, os resultados deste estudo apontam que tanto na administração aguda quanto na administração crônica, GNP-10 e GNP-30 apresentaram altas frequências e índices de dano ao DNA em cérebro de ratos quando comparado ao grupo controle. No entanto, apenas a administração aguda de GNP-30 apresentou maior frequência e índice de dano ao DNA quando comparado à administração aguda de GNP-10, ou seja, a GNP-30, nesse caso, apresentou maior toxicidade. Ainda, pode-se observar que a frequência e o índice de dano ao DNA causados pela administração crônica de GNP-10 e GNP-30 foram significativamente maiores quando comparado ao grupo controle, no entanto, não foram observadas quaisquer diferenças significativas na genotoxicidade, que sugere ser independente do tamanho das partículas.

Em tempo, a administração crônica causou significamente maior dano ao DNA quando comparado à administração aguda.

A priori, esse resultado parece discrepante em relação aos demais reportados na literatura. Era de se esperar que as nanopartículas de 10 nm, sendo mais reativas, conduzissem a maiores índices e frequências de danos em DNA. Contudo, nossos achados podem ser racionalizados na forma em que esse estudo foi conduzido, uma vez que foram utilizadas nanopartículas de ouro recobertas e estabilizadas por citrato de sódio, também usado como agente redutor e estabilizante no preparo das mesmas. Na obtenção de nanopartículas de 10 nm de diâmetro empregou-se uma concentração molar cerca de 16 vezes maior do que a usada na preparação das GNP de 30 nm, o que poderia explicar a menor toxicidade encontrada. Em adição, medidas de potencial Zeta de nossas nanopartículas apresentaram valores de -30 mV e -35 mV para diâmetros de 10 e 30 nm, respectivamente. Estes valores de potencial zeta indicam a estabilidade das soluções de nanopartículas usadas neste estudo e corroboram os achados de UV-vis. Ainda, os espectros eletrônicos das soluções monitoradas diariamente ao longo de uma semana, não revelaram qualquer alteração do comprimento de onda na máxima absorção. Em tempo, o valor de potencial Zeta de uma nanopartícula é um parâmetro muito utilizado para prever a estabilidade da suspensão coloidal, sendo consideradas muito estáveis as que apresentam valores de potencial Zeta superiores a +30 mV ou inferiores a -30 mV (Clogston & Patri, 2011; Wu et al., 2011), isto reforça que neste estudo foram empregadas nanopartículas muito estáveis e com potenciais muito próximos .

Um estudo conduzido com nanopartículas “nuas”, isto é, removendo-se parcialmente ou totalmente o citrato de sódio poderia trazer mais informações para elucidar estas questões. Resultados análogos foram observados por Paino et al. (2012). Por outro lado, estudo de Siddiqi et al. (2012), mostrou aumento nos níveis de 8-hidroxideoxiguanosina (8OhdG), um produto do ataque a base guanina do DNA, após exposição a GNP 20 nm. Além disso, é conhecido que GNP induz dano oxidativo ao DNA em células (Li et al., 2008; Grigg et al., 2009; Kang et al., 2009). No entanto, alguns estudos contradizem estes resultados (Kang et al., 2009; Singh et al., 2010). Por exemplo, estudo de Kang et al. (2009), observou que GNP 100 nm causou dano no DNA em células, porém GNP 4 e 15 nm não causaram danos. Ademais, no mesmo estudo foi demonstrado que GNP 60 nm ou menores não causam dano no DNA. No entanto, outros estudos já mostraram que houve dano no DNA após exposição à GNP 20 nm (Li et

al., 2008) e 8 nm (Grigg et al., 2009), mas não com 10 nm (Singh et al., 2010).

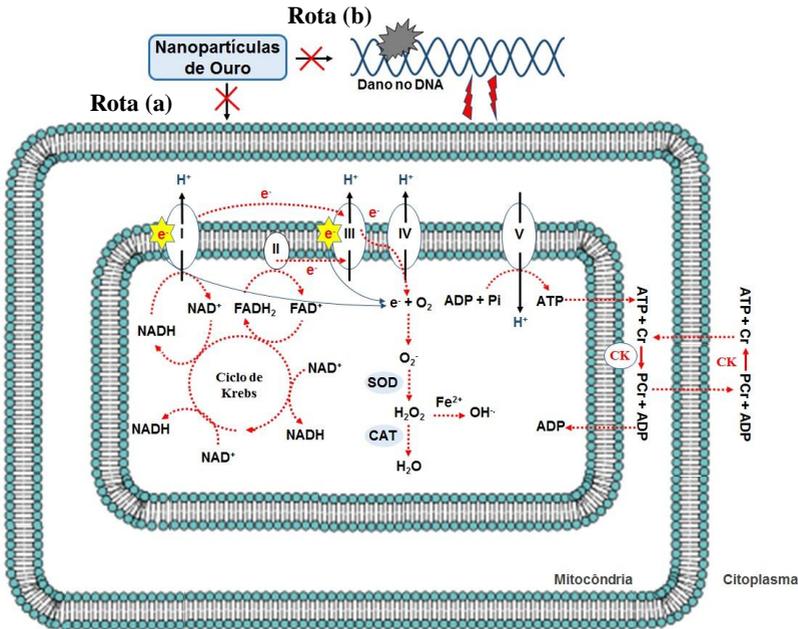
Neste sentido, quando se compara resultados de diferentes estudos, que abordam toxicidade de nanopartículas usando diferentes metodologias, *in vitro* ou *in vivo*, por exemplo, onde neste último, o sangue contém eletrólitos que podem alterar a carga de superfície efetiva das nanopartículas bem como seu estado de agregação, isso poderia ser uma explicação razoável para tal contradição dos resultados encontrados na literatura.

Muitas investigações toxicológicas sobre a GNP centralizaram na citotoxicidade (Goodman et al., 2004; Connor et al., 2005; Shukla et al., 2005; Tsoli et al., 2005; Pernodet et al., 2006; Pan et al., 2007; Jacobsen et al., 2009; Pan et al., 2009; Ponti et al., 2009) e poucos avaliaram a genotoxicidade (Li et al., 2008; Grigg et al., 2009; Jacobsen et al., 2009; Kang et al., 2009; Kang et al., 2010; Pfaller et al., 2010). Por conseguinte, estudos mostraram aumento dos níveis de quebras em fitas simples (via teste cometa) no DNA celular (Grigg et al., 2009; Kang et al., 2009; Singh et al., 2010), sendo que o mecanismo de dano no DNA induzido por GNP não foram claramente estabelecidos, embora Li et al. (2008) tenham demonstrado que o dano no DNA está correlacionado com a baixa regulação de proteínas específicas de reparo. Por outro lado as nanopartículas apresentam afinidades com grupamentos aminas (Katz & Willner, 2004; Ojea-Jiménez & Puentes, 2009) e o DNA é uma molécula formada por duas cadeias na forma de uma dupla hélice, constituídas de uma pentose, um grupo fosfato e uma base nitrogenada (Clausen-Schaumann et al., 2000), podendo ter apresentado afinidades desses agrupamentos aminas da molécula do DNA com as GNP.

Por conseguinte, sabe-se que um dano no DNA pode levar a alterações nas transcrições proteicas, entre elas nas enzimas do metabolismo energético, repercutindo na produção de proteínas anormais, comprometendo a renovação celular e em longo prazo a função de sistemas orgânicos inteiros (Farinatti, 2002; Neto & Cunha, 2002; Rebelatto & Morelli, 2007; Ferreira et al., 2008).

Com base nos resultados do presente estudo, sugere-se que a GNP inibi o metabolismo energético, conseqüentemente, diminui o transporte de elétrons, tal qual pode contribuir para a diminuição na produção de EROs, bem como alterar a defesa antioxidante numa tentativa de reparo. Ainda, estas alterações podem causar dano ao DNA. Por outro lado, a GNP, devido a sua capacidade de atravessar barreiras biológicas e possuir afinidades com grupamentos aminas, pode causar primeiro dano ao DNA, comprometendo a função das enzimas do

metabolismo energético que, posteriormente, poderá resultar na diminuição da produção de EROs, bem como alteração da defesa antioxidante (fig. 23).



**Fig. 23.** Relação entre metabolismo energético, estresse oxidativo e dano ao DNA. Possíveis rotas de ação/efeito de GNP em células cerebrais de ratos Wistar.

Rota (a): as GNP podem causar dano mitocondrial, inibição da atividade das enzimas do ciclo de Krebs, inibição dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial e enzima creatina quinase, conseqüentemente, diminuir o transporte de elétrons, contribuindo para a diminuição na produção de EROs e alteração da defesa antioxidante numa tentativa de reparo. Ainda, estas alterações podem causar dano ao DNA.

Rota (b): as GNP, devido a sua capacidade de atravessar barreiras biológicas e possuir afinidades com grupamentos amins, podem causar primeiro dano ao DNA e conseqüentemente comprometer a função das enzimas do metabolismo energético, resultando na diminuição da produção de EROs, bem como podem causar alterações das enzimas de defesa antioxidante.

As setas vermelhas pontilhadas indicam inibição e/ou alteração.

Se por um lado nossos achados demonstraram que GNP-10 e GNP-30 causam dano no metabolismo energético, dano oxidativo e

dano em DNA, por outro lado há evidências de que a toxicidade de nanomateriais pode ser modulada em função da associação destes com agentes estabilizantes e de recobrimento (Vecchio et al., 2012). No entanto, parece evidente que a toxicidade das GNP está relacionada a fatores bióticos (mecanismos de atuação e interação das GNP com a membrana celular) e abióticos (propriedades físicas e químicas das GNP e seus íons solúveis), tornando uma explicação razoável para todos estes achados, uma vez que, o pequeno tamanho e elevada área superficial apresentada pelas nanopartículas, conduz a uma elevada reatividade química.

Aliado a isso, recentes estudos vem mostrando possíveis mecanismos de atuação e interação de nanopartículas metálicas com processos que podem acarretar desestabilização tanto dentro quanto fora da célula, causar desestruturação e ruptura da membrana, dano oxidativo a proteína e lipídeos da própria membrana e, no seu interior podem interferir na atividade da CAT e GPx, lipoperoxidação, produção de espécies reativas de oxigênio e dano ao DNA, levando a processos nocivos que se tornam generalizados em toda a célula, causando uma desordem ou até mesmo a morte celular (Lapresta-Fernández et al., 2012).

Neste sentido, o conhecimento relacionado a esses fatores bióticos e abióticos parecem ser uma característica chave para compreensão do potencial funcional e tóxico das nanopartículas. Ademais, nossos resultados, não devem servir como um desincentivo ao uso desses nanomateriais. No futuro, um melhor conhecimento dos efeitos neurotóxicos associados aos mecanismos de ação e interação, tipo de administração, tamanho de partícula, natureza dos agentes estabilizadores e de recobrimento poderão maximizar os efeitos benéficos bem como minimizar os seus efeitos adversos destes nanomateriais, tornando-os desta forma, seguros para que possam ser usados em situações clínicas reais.

## 6 CONCLUSÃO

Nesse trabalho, concluiu-se que as GNP sintetizadas e caracterizadas apresentaram forma e tamanhos correspondentes ao diâmetro médio de GNP-10 e GNP-30. Além disso, concluiu-se que a administração aguda e crônica de GNP-10 e GNP-30 causou inibição do metabolismo energético. Por outro lado, os níveis de TBARS e carbonilação de proteínas foram diminuídos após a administração aguda de GNP-10 e GNP-30, mas não houve alteração desses parâmetros pela administração crônica. Ambas as administrações e tamanhos, principalmente, aumentou a atividade da SOD e inibiu a atividade da CAT. Concluiu-se ainda que a GNP induziu altos níveis de danos ao DNA após administração aguda e crônica de GNP-10 e GNP-30. Sendo que os níveis de danos ao DNA apresentados pela administração crônica foram, significativamente, maiores que os apresentados pela administração aguda.

## 7 PERSPECTIVAS

Pretendemos dar continuidade a este trabalho, confirmando nossos resultados e expandindo-os. Desta forma, nossas perspectivas são:

- Sintetizar e caracterizar GNP com outros tamanhos (maiores) e também com outros agentes estabilizantes;
- Avaliar diferentes agentes estabilizadores;
- Avaliar os efeitos da administração aguda e crônica de GNP (tamanhos maiores) sobre parâmetros bioquímicos em cérebro de ratos;
- Avaliar o efeito da administração aguda e crônica de GNP sobre parâmetros comportamentais;
- Dosar a enzima acetilcolinesterase;
- Avaliar uma curva cinética de tempo-resposta (1d, 7d, 14d, 21d e 28d);
- Avaliar doses diferentes.

## REFERÊNCIAS

- Adam-Vizi V. Production of reactive oxygen species in brain mitochondria: contribution by electron transport chain and non-electron transport chain sources. *Antioxid Redox Signal*. 2005; 7(9-10):1140-9.
- Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol*. 1984; 105:121-6.
- Alexander GE, DeLong MR, Strick PL. Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex. *Annu Rev Neurosci*. 1986; 9:357-81.
- Alivisatos AP. Nanocrystals: building blocks for modern materials design. *Endeavour*. 1997; 21(2):56-60.
- Alivisatos AP. Semiconductor clusters, nanocrystals, and quantum dots. *Science*. 1996; 271(5251):933-7.
- Alkilany AM, Murphy CJ. Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: what we have learned so far? *J Nanopart Res*. 2010; 12(7):2313-33.
- Armstrong B, Hutchinson E, Unwin J, Fletcher T. Lung cancer risk after exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: a review and meta-analysis. *Environ Health Perspect*. 2004; 112(9):970-8.
- Aromal SA, Philip D. Green synthesis of gold nanoparticles using *Trigonella Foenumgraecum* and its size-dependent catalytic activity. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2012; 97:1-5.
- Auffan M, Rose J, Orsiere T, Meo MD, Thill A, Zeyons O, Proux O, Masion A, Chaurand P, Spalla O, Botta A, Wiesner MR, Bottero J. CeO<sub>2</sub> nanoparticles induce DNA damage towards human dermal fibroblasts in vitro. *Nanotoxicol*. 2009; 3(2):161-71.
- Avakian MD, Dellinger R, Fiedler H, Gullet B, Koshland C, Marklund S, Oberdorster G, Safe S, Sarofim A, Smith KR, Schwartz D, Suk WA. The origin, fate, and health effects of combustion by-products: a research framework. *Environ Health Perspect*. 2002; 110(11):1155-62.

Balasubramanian SK, Yang L, Yung LY, Ong CN, Ong WY, Yu LE. Characterization, purification, and stability of gold nanoparticles. *Biomaterials*. 2010; 31(34):9023-30.

Bannister JV, Calabrese L. Assays for SOD. *Methods Biochem Anal*. 1987; 32:279-312.

Barbu E, Molnár E, Tsibouklis J, Górecki DC. The potential for nanoparticle-based drug delivery to the brain: overcoming the blood-brain barrier. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2009; 6(6):553-65.

Barp J, Araujo AS, Fernandes TR, Rigatto KV, Llesuy S, Bello-Klein A, Singal P. Myocardial antioxidant and oxidative stress changes due to sex hormones. *Braz J Med Biol Res*. 2002; 35(9):1075-81.

Bastus NG, Sánchez-Tilló E, Pujals S, Farrera C, López C, Giralt E, Celada A, Lloberas J, Puntès V. Homogeneous conjugation of peptides onto gold nanoparticles enhances macrophage response. *ACS Nano*. 2009; 3(6):1335-44.

Beal M. Aging, energy, and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Ann Neurol*. 1995; 38(3):357-66.

Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Bioquímica*. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.

Bhattacharya R, Mukherjee P. Biological properties of “naked” metal nanoparticles. *Adv Drug Deliver Rev*. 2008; 60(11):1289-306.

Boveris A, Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J*. 1973; 134(3):707-16.

Bowling A, Beal M. Bioenergetic and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Life Sci*. 1995; 56(14):1151-71.

Brendler-Schwaab S, Hartmann A, Pfuhler S, Speit G. The in vivo comet assay: use and status in genotoxicity testing. *Mutagenesis*. 2005; 20(4):245-54.

Brooking J, Davis SS, Illum L. Transport of nanoparticles across the rat nasal mucosa. *J Drug Target.* 2001; 9(4):267-79.

Brown DM, Wilson MR, Macnee W, Stone V, Donaldson K. Size-dependent proinflammatory effects of ultrafine polystyrene particles: a role for surface area and oxidative stress in the enhanced activity of ultrafines. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2001; 175(3):191-9.

Burlinson B, Tice RR, Speit G, Agurell E, Brendler-Schwaab SY, Collins AR, Escobar P, Honma M, Kumaravel TS, Nakajima M, Sasaki YF, Thybaud V, Uno Y, Vasquez M, Hartmann A. Fourth international workgroup on genotoxicity testing: results of the in vivo comet assay workgroup. *Mutat Res.* 2007; 627(1):31-5.

Bystrzejewska-Piotrowska G, Golimowski J, Urban PL. Nanoparticles: their potential toxicity, waste and environmental management. *Waste Manag.* 2009; 29(9):2587-95.

Cassina A, Radi R. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Arch Biochem Biophys.* 1996; 328(2):309-16.

Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev.* 1979; 59(3):527-605.

Chen Z, Meng H, Xing G, Chen C, Zhao Y, Jia G, Wang T, Yuan H, Ye C, Zhao F, Chai Z, Zhu C, Fang X, Ma B, Wan L. Acute toxicological effects of copper nanoparticles in vivo. *Toxicol Lett.* 2006; 163(2):109-20.

Chen Y, Gu X, Nie CG, Jiang ZY, Xie ZX, Lin CJ. Shape controlled growth of gold nanoparticles by a solution synthesis. *Chem Commun (Camb).* 2005; (33):4181-3.

Chen YS, Hung YC, Lin LW, Liao I, Hong MY, Huang GS. Size-dependent impairment of cognition in mice caused by the injection of gold nanoparticles. *Nanotechnology.* 2010; 21(48):485102.

Chihuailaf RH, Contreras PA, Wittwer FG. Pathogenesis of oxidative stress: consequences and evaluation in animal health. *Vet Mex.* 2002; 33(3):265-83.

Clark JB, Bates TE, Cullingford T, Land JM. Development of enzymes of energy metabolism in the neonatal mammalian brain. *Dev Neurosci*. 1993; 15(3-5):174-80.

Clarkson PM, Thompson HS. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? *Am J Clin Nutr*. 2000; 72(2):637-46.

Clausen-Schaumann H, Rief M, Tolksdorf C, Gaub H. Mechanical stability of single DNA molecules. *Biophys*. 2000; 78(4):1997-2007.

Clogston JD, Patri AK. Zeta Potential measurement. In: McNeil SE, editor. *Characterization of nanoparticles intended for drug delivery*. New York: Humana Press; 2011. p.63-70.

Collins AR. Investigating oxidative DNA damage and its repair using the comet assay. *Mutat Res*. 2007; 681(1):24-32.

Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications and limitations. *Mol Biotechnol*. 2004; 26(3):249-61.

Connor EE, Mwamuka J, Gole A, Murphy CJ, Wyatt MD. Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity. *Small*. 2005; 1(3):325-7.

Cooke MS, Olinski R, Evans MD. Does measurement of oxidative damage to DNA have clinical significance? *Clin Chim Acta*. 2006; 365(1-2):30-49.

Costa CS, Ronconi JVV, Daufenbach JF, Gonçalves CL, Rezin GT, Streck EL, Paula MMS. In vitro effects of silver nanoparticles on the mitochondrial respiratory chain. *Mol Cell Biochem*. 2010; 342(1-2):51-6.

Dalle-Donne I, Aldini G, Carini M, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Protein carbonylation, cellular dysfunction and disease progression. *J Cell Mol Med*. 2006; 10(2):389-406.

Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta*. 2003; 329(1-2):23-38.

Daum G. Lipidas of mitochondria. *Biochim Biophys Acta*. 1985; 822(1):1-42.

Davis J, Hunnicutt EJ, Chisholm J. A mitochondrial bottleneck hypothesis of Alzheimer's disease. *Mol Med Today*. 1995; 1(5):240-7.

Day P. Room at the bottom. *Chemistry in Britain*. 1996; 32:29-31.

Del Maestro RF, Bjork J, Arfors KE. Increase in microvascular permeability induced by enzymatically generated free radicals. In vivo study. *Microvasc Res*. 1981; 22(3):239-54.

Devlin TM, Michelacci YM. *Manual de bioquímica com correlações clínicas*. 7ª ed. São Paulo: Edgard Blücher; 2003.

Di Filippo C, Cuzzocrea S, Rossi F, Marfella R, D'Amico M. Oxidative stress as the leading cause of acute myocardial infarction in diabetics. *Cardiovasc Drug Rev*. 2006; 24(2):77-87.

Dickinson C. Cerebral oxidative metabolism in hypertension. *Clin Sci (Lond)*. 1996; 91(5):539-50.

Dohnert MB, Venâncio M, Possato JC, Zeferino RC, Dohnert LH, Zugno AI, de Souza CT, Paula MMS, Luciano TF. Gold nanoparticles and diclofenac diethylammonium administered by iontophoresis reduce inflammatory cytokines expression in Achilles tendinitis. *Int J Nanomed*. 2012; 7:1651-7.

Dougherty DD, Bonab AA, Spencer TJ, Rauch SL, Madras BK, Fischman AJ. Dopamine transporter density in patients with attention deficit hyperactivity disorder. *Lancet*. 1999; 354:2132-3.

Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol*. 1990; 186:421-31.

Drexler E. *Engines of creation, the coming era of nanotechnology*. 1ª ed. New York: Anchor Books; 1986.

Drexler E, Peterson C. *Unbounding the future: the nanotechnology revolution*. New York: William Morrow and Company; 1991.

Duran N, Mattoso LHC, Moraes PC. Nanotecnologia: introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação. Artliber: São Paulo; 2006.

Emerit J, Edeas M, Bricaire F. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biomed Pharmacother.* 2004; 58(1):39-46.

Erecinska M, Nelson D, Yudkoff M, Silver IA. Energetics of the nerve terminal in relation to central nervous system function. *Biochem Soc Trans.* 1994; 22(4):959-65.

Erecinska M, Silver I. Ions and energy in mammalian brain. *Prog Neurobiol.* 1994; 43(1):37-71.

Faloon GR, Srere PA. Escherichia coli citrate synthase. Purification and the effect of potassium on some properties. *Biochemistry.* 1969; 8(11):4497-503.

Farinatti PTV. Teorias Biológicas do envelhecimento: do genético ao estocástico. *Rev Bras Med Esporte.* 2002; 8(4):129-38.

Faust F, Kassie F, Knasmüller S, Boedecker RH, Mann M, Mersch-Sundermann V. The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. *Mutat Res.* 2004; 566(3):209-29.

Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *RAMB.* 1997; 43(1):61-8.

Ferreira M, Aguiar T, Vilarinho L. Cadeia respiratória mitocondrial: aspectos clínicos, bioquímicos, enzimáticos e moleculares associados ao déficit do complexo I. *Arqui Med.* 2008; 22(2-3):49-56.

Fischer HC, Chan WC. Nanotoxicity: the growing need for in vivo study. *Curr Opin Biotechnol.* 2007; 18(6):565-71.

Fischer JC, Ruitenbeek W, Berden JA, Trijbels JM, Veerkamp JH, Stadhouders AM, Sengers RC, Janssen AJ. Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Clin Chim Acta.* 1985; 153(1):23-6.

Freestone I, Meeks N, Sax M, Higgitt C. The Lycurgus Cup – A Roman Nanotechnology. *Gold Bulletin*. 2007; 40(4):270-7.

Frey TG, Mannella CA. The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem Sci*. 2000; 25(7):319-24.

Gaivão I, Piasek A, Brevik A, Shapohnikov S, Collins AR. Comet assay-based methods for measuring DNA repair *in vitro*; estimates of inter- and intra-individual variation. *Cell Biol Toxicol*. 2007; 25(1):45-52.

Gameiro PH. Efeito antimutagênico do extrato aquoso de agaricus brasilienses em cultura de linfócitos humanos [Trabalho de Conclusão de Curso]. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, Curso de Ciências Biológicas-Bacharelado; 2005.

Ghosh P, Han G, De M, Kim CK, Rotello VM. Gold nanoparticles in delivery applications. *Adv Drug Deliv Ver*. 2008; 60(11):1307-15.

Gontijo AMMC, Tice R. Teste de cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: Ribeiro LR; Salvadori DMF, Marques EK. *Mutagênese Ambiental*. Canoas: Ulbra; 2003. p. 247-271.

Goodman CM, McCusker CD, Yilmaz T, Rotello VM. Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains. *Bioconjugate Chem*. 2004; 15(4):897-900.

Grigg J, Tellabati A, Rhead S, Almeida GM, Higgins JA, Bowman KJ, Jones GD, Howes PB. DNA damage of macrophages at an air-tissue interface induced by metal nanoparticles. *Nanotoxicol*. 2009; 3(4):348-5.

Guerci A, Liviach D, Marcos R. Detection of excision repaired DNA damage in comet assay by using Ara-C and hydroxyurea in three different cell types. *Cell Biol Toxicol*. 2007; 25(1):73-80.

Gutteridge JM, Halliwell B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann N Y Acad Sci*. 2000; 899:136-47.

Halliwell B. Oxidants and human disease: some new concepts. *The FASEB J*. 1987; 1(5):358-64.

Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet*. 1994; 344(8924):721-4.

Halliwell B. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic Res*. 1999; 31(4):261-72.

Halliwell B. Reactive species and antioxidants. redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol*. 2006; 141(2):312-22.

Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. London: Oxford; 1999.

Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. 4<sup>a</sup> ed. New York: University Press; 2007.

Hammer B, Norskov JK. Why gold is the noblest of all the metals. *Nature*. 1995; 376:238-240.

Hartmann A, Agurell E, Beevers C, Brendler-Schwaab S, Burlinson B, Clay P, Collins A, Smith A, Speit G, Thybaud V, Tice RR. Recommendations for conducting the in vivo alkaline comet assay: 4th International Comet Assay Workshop. *Mutagenesis*. 2003; 18(1):45-51.

Hu YL, Gao JQ. Potential neurotoxicity of nanoparticles. *Int J Pharm*. 2010; 394(1-2):115-21.

Huang X, El-Sayed IH, Qian W, El-Sayed MA. Cancer cell imaging and photothermal therapy in the near-infrared region by using gold nanorods. *J Am Chem Soc*. 2006; 128(6):2115-20.

Hughes BP. A method for estimation of serum creatine kinase and its use in comparing creatine kinase and aldolase activity in normal and pathologic sera. *Clin Chim Acta*. 1962; 7:597-604.

Huttemann M, Lee I, Pecinova A, Pecina P, Przyklenk K, Doan JW. Regulation of oxidative phosphorylation, the mitochondrial membrane potential, and their role in human disease. *J Bioenerg Biomembr.* 2008; 40(5):445-56.

Jacobsen NR, Moller P, Jensen KA, Vogel U, Ladefoged O, Loft S, Wallin H. Lung inflammation and genotoxicity following pulmonary exposure to nanoparticles in ApoE(-/-) mice. *Part Fibre Toxicol.* 2009; 6:2.

Jain PK, Huang X, El-Sayed IH, El-Sayed MA. Review of some interesting surface plasmon resonance-enhanced properties of noble metal nanoparticles and their applications to biosystems. *Plasmonics.* 2007a; 2(3):107-18.

Jain PK, El-Sayed IH, El-Sayed MA. Au nanoparticles target cancer. *Nano Today.* 2007b; 2(1):18-29.

Juzenas P, Chen W, Sun YP, Coelho MA, Generalov R, Generalova N, Christensen IL. Quantum dots and nanoparticles for photodynamic and radiation therapies of cancer. *Adv Drug Del Rev.* 2008; 60(15):1600-14.

Kang JS, Yum YN, Kim JH, Song H, Jeong J, Lim YT, et al. 2009. Induction of DNA damage in L5178Y cells treated with gold nanoparticle. *Biomol Therapeut.* 2009; 17(1):92-7.

Kang B, Mackey MA, El-Sayed MA. Nuclear targeting of gold nanoparticles in cancer cells induces DNA damage, causing cytokinesis arrest and apoptosis. *J Am Chem Soc.* 2010; 132(5):1517-9.

Katz E, Willner I. Integrated nanoparticle-biomolecule hybrid systems: synthesis, properties, and applications. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2004; 43(45):6042-108.

Kim NH, Lee MY, Park SJ, Choi JS, Oh MK, Kim IS. Auranofin blocks interleukin-6 signalling by inhibiting phosphorylation of JAK1 and STAT3. *Immunology.* 2007; 122(4):607-14.

Kitto GB. Intra-and extramitochondrial malate dehydrogenases from chicken and tuna heart. *Methods Enzymol.* 1969; XIII:106-16.

Kornhauser A, Wamer WG, Lambert LL. Light-induced dermal toxicity: Effects on the cellular and the molecular level. In: Marzulli, FN, Maibach HI, editores. *Dermal toxicology*. 4<sup>a</sup> ed. New York: Hemisphere; 1991. p.527-569.

Koury JC, Donangelo CM. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. *Rev Nutr*. 2003; 16(4):433-41.

Koziara JM, Lockman PR, Allen DD, Mumper RJ. The blood-brain barrier and brain drug delivery. *J Nanosci Nanotechnol*. 2006; 6(9-10):2712-35.

Kreuter J. Influence of the surface properties on nanoparticle-mediated transport of drugs to the brain. *J Nanosci Nanotechnol*. 2004; 4(5):484-8.

Kreuter J. Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. *Adv Drug Deliv Rev*. 2001; 47(1):65-81.

Kuloglu M, Ustundag B, Atmaca M, Canatan H, Tezcan AE, Cinkilinc N. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme levels in patients with schizophrenia and bipolar disorder. *Cell Biochem Funct*. 2002; 20(2):171-5.

Kumaravel TS, Jha AN. Reliable Comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionizing radiation and chemicals. *Mutat Res*. 2006; 605(1-2):7-16.

Lai YL, Rodarte JR, Hyatt RE. Effect of body position on lung emptying in recumbent anesthetized dogs. *J Appl Physiol*. 1977; 43(6):983-7.

Lapresta-Fernández A, Fernández A, Blasco J. Nanoecotoxicity effects of engineered silver and gold nanoparticles in aquatic organisms. *Trends Analyt Chem*. 2012; 32:40-59.

Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. *Princípios de bioquímica*. 4<sup>a</sup> ed. São Paulo: Sarvier; 2007.

Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Stadtman ER. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 1990; 186:464-78.

Lewinski N, Colvin V, Drezek R. Cytotoxicity of nanoparticles. *Small.* 2008; 4(1):26-49.

Li JJ, Zou L, Hartono D, Ong CN, Bay BH, Yung LYL. Gold nanoparticles induce oxidative damage in lung fibroblasts in vitro. *Adv Mat.* 2008; 20(1):138-42.

Link S, El-Sayed MA. Size and temperature dependence of the plasmon absorption of colloidal gold nanoparticles. *J Phys Chem B.* 1999; 103(21):4212-7.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193(1):265-7.

Maes M, Galecki P, Chang YS, Berk M. A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro) degenerative processes in that illness. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2011; 35(3):676-92.

Ma L, Liu J, Li N, Wang J, Duan Y, Yan J, Liu H, Wang H, Hong F. Oxidative stress in the brain of mice caused by translocated nanoparticulate TiO<sub>2</sub> delivered to the abdominal cavity. *Biomaterials.* 2010; 31(1):99-105.

Maciel AP, Longo E, Leite ER. Dióxido de estanho nanoestruturado: síntese e crescimento de nanocristais e nanofotas. *Quim Nova.* 2003; 26(6):855-62.

Mann S. Nanotechnology and construction. *Nanoforum report.* Stirling: Institute of Nanotechnology; 2006.

Maxwell SR. Prospects for the use of antioxidant therapies. *Drugs.* 1995; 49(3):345-61.

McCord JM. Oxygen-derived radicals: a link between reperfusion injury and inflammation. *Fed Proc.* 1987; 46(7):2402-6.

- Moller P. The alkaline comet assay: towards validation in biomonitoring of DNA damaging exposures. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2006; 98(4):336-45.
- Moore MN. Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? *Environ Int.* 2006; 32(8):967-76.
- Morose G. The 5 principles of "Design for Safer Nanotechnology", *J. Clean. Prod.* 18, 285–289 (2010)
- Navarro A, Boveris A. The mitochondrial energy transduction system and the aging process. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007; 292(2):670-86.
- Nelson DL, Cox MM. *Lehninger: principles of biochemistry.* 3<sup>a</sup> ed. New York: Worth publishers; 2000.
- Neto EA, Cunha GL. Teorias biológicas do envelhecimento. In: Freitas, EV et al., editores. *Tratado de Geriatria e Gerontologia.* 1<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002. p.13 -19.
- Nestler EJ. Is there a common molecular pathway for addiction? *Nat Neurosci.* 2005; 8(11):1445-9.
- Nicholls DG, Budd SL. Mitochondria and neuronal survival. *Physiol Rev.* 2000; 80(1):315-60.
- Nussbaum RL, Mcinnes RR, Hurtington FW. Thompson & Thompson: genética médica. 6<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002.
- Oberdorster G, Oberdorster E, Oberdorster J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect.* 2005; 113(7):823-39.
- Oberdorster G, Sharp Z, Atudorei V, Elder A, Gelein R, Kreyling W, Cox C. Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhal Toxicol.* 2004; 16(6-7):437-45.
- Ojea-jiménez I, Puentes V. Instability of cationic gold nanoparticle bioconjugates: the role of citrate ions. *J Am Chem Soc.* 2009; 131(37):13320-7.

Okayama Y. Oxidative stress in allergic and inflammatory skin diseases. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2005; 4(4):517-9.

Paino IMM, Marangoni VS, de Oliveira RCS, Antunes LMG, Zucolotto V. Cyto and genotoxicity of gold nanoparticles in human hepatocellular carcinoma and peripheral blood mononuclear cells. *Toxicol Lett*. 2012; 215(2):119-25.

Pan Y, Leifert A, Ruau D, Neuss S, Bornemann J, Schmid G, Brandau W, Simon U, Jahnen-Dechent W. Gold nanoparticles of diameter 1.4 nm trigger necrosis by oxidative stress and mitochondrial damage. *Small*. 2009; 5(18):2067-76.

Pan Y, Neuss S, Leifert A, Fischler M, Wen F, Simon U, Schmid G, Brandau W, Jahnen-Dechent W. Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles. *Small*. 2007; 3(11):1941-9.

Paula MMS, Costa CS, Baldin MC, Scaini G, Rezin GT, Segala K, Andrade VM, Franco CV, Streck EL. *In vitro* effect of silver nanoparticles on creatine kinase activity. *J Braz Chem Soc*. 2009; 20(8):1556-60.

Pereira D, Petronilho F, Pereira H, Vuolo F, Mina F, Possato J, Vitto MF, de Souza DR, da Silva L, da Silva Paula MM, de Souza CT, Dal-Pizzol F. Effects of gold nanoparticles on endotoxin-induced uveitis in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012; 53(13):8036-41.

Peres W, Tunon MJ, Collado PS, Herrmann S, Marroni N, Gonzalez-Gallego J. The flavonoid quercetin ameliorates liver damage in rats with biliary obstruction. *J Hepatol*. 2000; 33(5):742-50.

Pernodet N, Fang X, Sun Y, Bakhtina A, Ramakrishnan A, Sokolov J, Ulman A, Rafailovich M. Adverse effects of citrate/gold nanoparticles on human dermal fibroblasts. *Small*. 2006; 2(6):766-73.

Pfaller T, Colognato R, Nelissen I, Favilli F, Casals E, Ooms D, Leppens H, Ponti J, Stritzinger R, Puentes V, Boraschi D, Duschl A, Oostingh GJ. The suitability of different cellular *in vitro* immunotoxicity and genotoxicity methods for the analysis of nanoparticle-induced events. *Nanotoxicology*. 2010; 4(1):52-72.

- Philip D. Synthesis and spectroscopic characterization of gold nanoparticles. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2008; 71(1):80-5.
- Ponti J, Sabbioni E, Munaro B, Broggi F, Marmorato P, Franchini F, Colognato R, Rossi F. Genotoxicity and morphological transformation induced by cobalt nanoparticles and cobalt chloride: an in vitro study in Balb/3T3 mouse fibroblasts. *Mutagenesis.* 2009; 24(5):439-45.
- Rahman MF, Wanga J, Pattersona TA, Sainia UT, Robinsonb BL, Newporta GD, Murdockc RC, Schlagerc JJ, Hussainc SM, Ali SF. Expression of genes related to oxidative stress in the mouse brain after exposure to silver-25 nanoparticles. *Toxicol Lett.* 2009; 187(1):15-21.
- Ramakrishnan S, Rajesh M, Sulochana KN. Eales' disease: oxidant stress and weak antioxidant defence. *Indian J Ophthalmol.* 2007; 55(2):95-102.
- Rebelatto JR, Morelli JGS. *Fisioterapia geriátrica: a prática da assistência ao idoso.* 2ª ed. São Paulo: Manole; 2007.
- Reddy PH. Mitochondrial medicine for aging and neurodegenerative diseases. *Neuromolecular Med.* 2008; 10(4):291-315.
- Reeves JF, Davies SJ, Dodd NJ, Jha AN. Hydroxyl radicals ( $\cdot\text{OH}$ ) are associated with titanium dioxide ( $\text{TiO}_2$ ) nanoparticle-induced cytotoxicity and oxidative DNA damage in fish cells. *Mutat Res.* 2008; 640(1-2):113-22.
- Roy P, Dhara K, Manassero M, Banerjee P. A new organic compound for the synthesis of gold nanoparticles. *Polyhedron.* 2008; 27(14):3085-90.
- Rustin P, Chretien D, Bourgeron T, Gérard B, Rötig A, Saudubray JM, Munnich A. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin Chim Acta.* 1994; 228(1):35-51.

Sarin H, Kanevsky AS, Wu H, Brimacombe KR, Fung SH, Sousa AA, Auh S, Wilson CM, Sharma K, Aronova MA, Leapman RD, Griffiths GL, Hall MD. Effective transvascular delivery of nanoparticles across the blood-brain tumor barrier into malignant glioma cells. *J Transl Med.* 2008; 6:1-15.

Schneider CD, Oliveira AR. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. *RBME.* 2004; 10(10):308-13.

Shapiro SD. Immunology: mobilizing the army. *Nature.* 2003; 421(6920):223-4.

Shukla R, Bansal V, Chaudhary M, Basu A, Bhonde RR, Sastry M. Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: a microscopic overview. *Langmuir.* 2005; 21(23):10644-54.

Siddiqi NJ, Abdelhalim MA, El-Ansary AK, Alhomida AS, Ong WY. Identification of potential biomarkers of gold nanoparticle toxicity in rat brains. *J Neuroinflammation.* 2012; 9:123.

Silva J, Erdtmann B, Henriques JAP. *Genética toxicológica.* Porto Alegre: Alcance; 2003.

Sims DE. Recent advances in pericyte biology--implications for health and disease. *Can J Cardiol.* 1991; 7(10):431-43.

Singh P, Kumari K, Katyal A, Kalra R, Chandra R. Synthesis and characterization of silver and gold nanoparticles in ionic liquid. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2009; 73(1):218-20.

Singh S, D'Britto V, Prabhune AA, Ramana CV, Dhawan A, Prasad BLV. Cytotoxic and genotoxic assessment of glycolipid-reduced and -capped gold and silver nanoparticles. *New J Chem.* 2010; 34:294-301.

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Experim Cell Res.* 1988; 175(1):184-91.

Sipos I, Tretter L, Adam-Vizi V. The production of reactive oxygen species in intact isolated nerve terminals is independent of the mitochondrial membrane potential. *Neurochem Res.* 2003; 28(10):1575-81.

Smith CM, Marks AD, Lieberman MA. Marks' basic medical biochemistry: a clinical approach. 2<sup>a</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005.

Smith CM, Marks AD, Lieberman M. Bioquímica médica básica de marks: uma abordagem clínica. 2<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: Artmed; 2007.

Sonavane G, Tomoda K, Makino K. Biodistribution of colloidal gold nanoparticles after intravenous administration: effect of particle size. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2008; 66(2):274-80.

Sonnenwald U, Hertz L, Schousboe A. Mitochondrial heterogeneity in the brain at the cellular level. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1998; 18(3):231-7.

Southern PA, Powis G. Free radicals in medicine. Chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clin Proc.* 1988; 63(4):381-9.

Sousa F, Mandal S, Garrovo C, Astolfo A, Bonifacio A, Latawiec D, Menk RH, Arfelli F, Huewel S, Legname G, Galla HJ, Krol S. Functionalized gold nanoparticles: a detailed in vivo multimodal microscopic brain distribution study. *Nanoscale.* 2010; 2(12):2826-34.

Speit G, Hartmann A. The comet assay (single cell gel test). A sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. *Method Mol Biol.* 1999; 13:203-12.

Sperling RA, Rivera Gil P, Zhang F, Zanella M, Parak WJ. Biological applications of gold nanoparticles. *Chem Soc Rev.* 2008; 37(9):1896-908.

Tedesco S, Doyle H, Blasco J, Redmond G, Sheehan D. Oxidative stress and toxicity of gold nanoparticles in *Mytilus edulis*. *Aquat Toxicol.* 2010; 100(2):178-86.

Tervonen T, Linkov I, Figueira JR, Steevens J, Chappell M, Merad M. Risk-based classification system of nanomaterials. *J Nanopart Res.* 2009; 11:757-66.

Thannickal VJ, Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000; 279(6):L1005-28.

Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen.* 2000; 35(3):206-21.

Tsoli M, Kuhn H, Brandau W, Esche H, Schmid G. Cellular uptake and toxicity of Au55 clusters. *Small.* 2005; 1(8-9):841-4.

Turkevich J, Stevenson P, Hillier J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discuss Faraday Soc.* 1951; 11:55-60.

Urso ML, Clarkson PM. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology.* 2003; 189(1-2):41-54.

Vecchio G, Galeone A, Brunetti V, Maiorano G, Rizzello L, Sabella S, Cingolani R, Pompa PP. Mutagenic effects of gold nanoparticles induce aberrant phenotypes in *Drosophila melanogaster*. *Nanomedicine.* 2012; 8(1):1-7.

Victor EG, Silveira PCL, Possato JC, da Rosa GL, Munari UB, de Souza CT, Pinho RA, da Silva L, Streck EL, Paula MM. 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.* 2012; 10:11.

Villela IV, Oliveira IM, Silva J, Henriques JAP. DNA damage and repair in haemolymph cells of golden mussel (*Limnoperna fortunei*) exposed to environmental contaminants. *Mut Res.* 2006; 605(1-2):78-86.

Voet D, Voet JG, Pratt CW. *Fundamentos de bioquímica.* Porto Alegre: Artmed; 2002.

Weir E, Lawlor A, Whelan A, Regan F. The use of nanoparticles in antimicrobial materials and their characterization. *Analyst*. 2008; 133(7):835-45.

Wyss M, Kaddurah-Daouk R. Creatine and creatine metabolism, *Physiol Rev*. 2000; 80(3):1170-213.

Yan W, Petkov V, Mahurin SM, Overbury SH, Dai S. Powder XRD analysis and catalysis characterization of ultra-small gold nanoparticles deposited on titania-modified SBA-15. *Catalysis Communications*. 2005; 6(6):404-08.

Zhang XD, Wu HY, Wu D, Wang YY, Chang JH, Zhai ZB, Meng AM, Liu PX, Zhang LA, Fan FY. Toxicologic effects of gold nanoparticles in vivo by different administration routes. *Int J Nanomedicine*. 2010; 5:771-81.

Wu L, Zhang J, Watanabe W. Physical and chemical stability of drug nanoparticles. *Adv Drug Deliv Rev*. 2011; 63(6):456-69.

## ANEXO A – Carta de Aprovação do CEUA



### Resolução

A Comissão de Ética no Uso de Animais, reconhecido pela Resolução n. 02/2011/Câmara Propex de acordo com a Lei Federal 11.794, analisou o projeto abaixo.

### Protocolo: 03/2012

### Professor:

Marcos Marques da Silva Paula

**Título:** “Efeito da administração de nanopartículas de ouro sobre parâmetros bioquímicos em cérebro de ratos”.

“Effects of gold nanoparticles administration on biochemical parameters in rat brain”.

Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicado a CEUA. Os membros da CEUA não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores. Para demais dúvidas contatar a CEUA.

[www.unesc.net/propex/ceua](http://www.unesc.net/propex/ceua).

Criciúma, 29 de fevereiro de 2012.

  
Jairo José Zocche  
Coordenador do CEUA