

LUDIMILA PEREIRA TARTUCE

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E BIOLÓGICA DA ASSOCIAÇÃO
ENTRE NANOPARTÍCULA DE OURO E MIBI NA LESÃO DE
REPERFUSÃO CARDÍACA**

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

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Aurino de Pinho.

Co-orientador: Prof. Dr. Michael Everton Andrades

CRICIÚMA, JULHO DE 2017

FOLHA INFORMATIVA

A dissertação foi elaborada seguindo o estilo Vancouver e será apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense, no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica do Exercício e no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente aos meus pais, meu irmão Paulo Filho, meus amigos Dr. João Paulo Sesconetto Júnior e Dr. Vicente Guerra Filho pelo incentivo e colaboração nas minhas atividades diárias para que eu pudesse concluir este trabalho.

A toda equipe do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica do Exercício - LAFIBE pelo apoio e ensinamentos fundamentais para a realização desse projeto, em especial a Dra. Renata Nesi, Fernanda Tavares, Giulia Fidelis e Hemelin Farias, por ter acompanhado toda a parte experimental deste projeto. Agradeço também imensamente meu orientador Dr. Ricardo Pinho por esses dois anos de orientação e aprendizados que pude ter.

Ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre, principalmente ao Dr. Michael Andrades e a Alessandra Machado, pelo suporte dado em toda a parte prática deste trabalho, muito obrigada!

RESUMO

O infarto agudo do miocárdio (IAM) se caracteriza por uma interrupção do fluxo de sangue para uma região específica do coração trazendo consequências severas à saúde podendo levar a morte. Os processos celulares envolvidos na resposta tecidual, precisam de intervenção terapêutica para não evoluir para necrose local e afetar o entorno da região infartada, com posterior perda da função contrátil do músculo cardíaco. Nanopartículas de ouro (NPAu) tem sido empregadas com potencial efeito anti-inflamatória e a sua associação à moléculas-guia, como o sestamibi, pode ser um possível alvo terapêutico que reduza os riscos associados à lesão por isquemia-reperfusão. Deste modo, o objetivo do presente estudo foi caracterizar química e biologicamente a administração de nanopartícula de ouro (NPAu) ligado ao sestamibi sobre a lesão de reperfusão após isquemia cardíaca. Ratos Wistar (n= 104) de 3 meses de idade foram expostos ao infarto por bloqueio temporário da artéria descendente anterior por 30 minutos seguido por reperfusão com administração intraventricular de sestamibi-NPAu nas concentrações de 0,5, 1,0 e 3 µg/kg. Os animais foram acompanhados por 24 horas seguidos por eutanásia. O sangue foi retirado por punção ventricular para análises de CTN, AST, ALT, creatinina, e uréia e a região infartada e não-infartada foram cirurgicamente removidas para análises histopatológicas. Assim, a nossa hipótese é de que a administração NPAu associada ao sestamibi tenha efeitos protetores na lesão por reperfusão sem prejuízo a outros órgãos, devido a cardioseletividade do sestamibi, e que possamos esclarecer os mecanismos envolvidos neste contexto.

Palavras Chave: Infarto, Isquemia, Reperfusão, Nanopartícula de Ouro, Sestamibi.

ABSTRACT

Acute myocardial infarction is characterized by a blood flow interruption to a specific heart region leading to severe health consequences and even death. The cellular mechanisms involved in tissue response need a therapeutic intervention preventing the local necrosis that can affect the infarcted surrounding area, with possible contractile function impairment of the heart muscle. Gold nanoparticles (GNP's) have been used due to its potential anti-inflammatory effects, and its association with guide molecules like sestamibi, can be and usable therapeutic target reducing the risks associated with ischemia-reperfusion lesions. Thus, the aim of the present study was to characterize chemical and biologically the sestamibi-linked gold nanoparticles administration over the post-reperfusion cardiac ischemia injury. Three months old Wistar rats (n=104) were exposed to an infarct situation caused by a 30 minutes anterior descending artery blockade, followed by intraventricular reperfusion with sestamibi-GNP administration with three different concentrations (0.5, 1 and 3ug/kg). The euthanasia happened after a 24 hours follow up. The blood was collected by a ventricular puncture for CTN, AST, ALT, creatinine and urea analysis, and the infarcted and noninfarcted heart areas were surgically removed to histopathological analysis. Thus, our hypothesis lays on the protector's effects of sestamibi-linked gold nanoparticles administration in the reperfusion injury along with no impairment to another organ due to sestamibi cardio selective properties.

Keywords: Infarction, Ischemia, Reperfusion, Gold Nanoparticle, Sestamibi.

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

ALT - Aminotransferase de alanina
ANOVA - Análise de variância
AST - Aminotransferase de aspartato
ATP - Adenosina trifosfato
AVC – Acidente vascular cerebral
BPM – Batidas por minuto
Ca² – Cálcio
CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
COOH – Grupo carboxila
CTN - Troponina
Cu - Cobre
DAC - Doença arterial coronariana
DCV – Doenças cardiovasculares
DLP – Dislipidemia
ERO – Espécies reativas de oxigênio
FA – Fosfatase alcalina
GSH – Glutathiona
H₂S – Sulfato de hidrogênio
HAS - Hipertensão arterial sistêmica
HAuCl₄ - Ácido cloroáurico
HCPA - Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HE - Hematoxilina e eosina
IAM – Infarto agudo do miocárdio
IC - Insuficiência cardíaca
ICP - Intervenção coronária percutânea
IL – Interleucina
IP - Intraperitoneal
IR – Isquemia e reperfusão
LR – Lesão de reperfusão
MIBI - 2-metoxi-isobutil-isonitrila
mRNA – RNA mensageiro
Na⁺ - Sódio

NPs – Nanopartículas

NPAu – Nanopartículas de ouro

OMS – Organização Mundial de Saúde

RC - Remodelamento cardíaco

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
1.1 LESÃO DE REPERFUSÃO	10
1.2 REMODELAMENTO CARDÍACO.....	12
1.3 NANOPARTÍCULAS DE OURO	14
1.4 SESTAMIBI	15
2 OBJETIVOS	17
2.1 OBJETIVO GERAL.....	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3 MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 AMOSTRA.....	18
3.2 DESENHO EXPERIMENTAL	19
3.3 PROTOCOLO DE ISQUEMIA-REPERFUSÃO	19
3.4 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO	20
3.5 ADMINISTRAÇÃO DE NPAU/SESTAMIBI.....	21
3.6 CARACTERIZAÇÃO DE NPAU E 2-METOXI-ISOBUTIL-ISONITRILA (MIBI)	21
3.7 MARCADORES DE DANO HEPÁTICO, RENAL E CARDÍACO	22
3.8 MARCADORES HISTOPATOLÓGICOS	22
3.9 TRATAMENTO ESTATÍSTICO	23
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA ASSOCIAÇÃO ENTRE NPAu E MIBI	24
4.2 EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO INTRAVENTRICULAR DE NAPU+MIBI SOBRE A TOXICIDADE CARDÍACA, HEPÁTICA E RENAL PELA ADMINISTRAÇÃO INTRAVENTRICULAR DE NAPU+SESTAMIBI APÓS O IAM.	28
4.3 PERFIL HISTOPATOLÓGICO CARDÍACO APÓS A ISQUEMIA/REPERFUSÃO FRENTE À ADMINISTRAÇÃO NPAU ASSOCIADA AO MIBI.....	31
REFERÊNCIAS	35

1 INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCV) são definidas como distúrbios do coração e vasos, e incluem doença arterial coronariana (DAC) e o acidente vascular cerebral (AVC). De acordo com o relatório da Organização Mundial da Saúde, as DCV foram responsáveis por 17,5 milhões de óbitos em 2012 (7,4 e 6,7 milhões devido a DAC e AVC, respectivamente), representando 31% de todas as mortes globais por ano, constituindo as principais causas de morte em todo o mundo (Who, 2017). No Brasil, as DCV foram responsáveis por 27,7% de todos os óbitos, representando a principal causa de morte em 2014, sendo o infarto agudo do miocárdio (IAM) a forma mais prevalente das DCV, ocupando a segunda causa de morte mais frequente (Piegas et al., 2015).

O IAM é o principal representante da doença arterial coronariana (DAC) que é caracterizada pela presença de placa aterosclerótica no lúmen arterial, a qual desencadeia a doença isquêmica no coração. São vários fatores de risco que contribuem para a formação de placa aterosclerótica como: predisposição genética, hipertensão arterial sistêmica (HAS), tabagismo, dislipidemia (DLP), sedentarismo, obesidade, entre outros (Yusuf et al., 2001). Nos casos em que a placa aterosclerótica aumenta sua espessura e compromete totalmente o lúmen da coronária ou processo de rompimento de sua capa fibrosa provocando a formação de um trombo intracoronariano, ocasionará obstrução à passagem do sangue pela coronária instalando o quadro de infarto agudo do miocárdio (Piegas et al., 2015).

Além da alta mortalidade no evento do IAM, as consequências do dano no músculo cardíaco acometido são graves e na maioria irreversíveis. Em decorrência do IAM, uma insuficiência cardíaca (IC) se estabelece em resposta à diminuição do débito cardíaco e conseqüentemente uma incapacidade de manter a demanda metabólica de todos os tecidos, contribuindo para um prejuízo da homeostase com graves danos ao paciente (Ho et al., 1993). A IC é um problema mundial de saúde, a qual provoca diminuição de expectativa de vida, aumento de morbidades, internações frequentes e conseqüente diminuição na qualidade de vida. A incidência de IC em indivíduos com idade entre 50 e 59 anos é de 0,2 - 0,3% aumentando em dez vezes entre 80 a 89 anos (Mehta et al., 2006).

Além do tempo de comprometimento do fluxo coronariano, diversos fatores podem determinar a extensão da área de disfunção miocárdica. Entre esses

fatores estão o aumento de mediadores inflamatórios, disfunção mitocondrial e consequentemente o estresse oxidativo (Bouras et al., 2014).

O tratamento padrão no IAM, é o restabelecimento do fluxo por medidas farmacológicas utilizando agentes fibrinolíticos ou mecânica realizando angioplastia coronariana (Piegas et al., 2015). A reperfusão tem a potencialidade de salvar o miocárdio isquêmico, entretanto, paradoxalmente pode causar ferimentos, um fenômeno chamado como "lesão de reperfusão" (LR) (Braunwald et al., 1985). Neste sentido, entende-se necessário o estudo de novos agentes com propriedades de minimizar os danos provocados pela reperfusão miocárdica, diminuindo o tamanho da área infartada e suas complicações clínicas imediatas e futuras (Piper et al., 1998).

1.1 LESÃO DE REPERFUSÃO

A isquemia é uma situação onde há interrupção ou comprometimento do fluxo sanguíneo enquanto que a reperfusão representa o retorno do fluxo sanguíneo a um órgão ou tecido após o processo isquêmico (Yellon et al., 2007). Durante o processo de isquemia miocárdica ocorrem mudanças fisiopatológicas em resposta ao insulto isquêmico no músculo cardíaco com disfunção sistólica e diastólica imediata. Na presença de miocárdio hibernado a lesão pode ser reversível após a restauração do fluxo miocárdio, mas quando há presença de necrose/apoptose a disfunção é irreversível (Olivetti et al., 1997).

Em situação de isquemia coronária provocada por obstrução coronária, devido à presença de placa aterosclerótica e/ou trombo intracoronariano, o ideal é recanalizar a artéria relacionada ao processo isquêmico. Contudo, na prática clínica, duas maneiras de restabelecer o fluxo coronário são utilizadas, uma delas é o uso de agentes fibrinolíticos, que é indicado nas primeiras horas após o evento isquêmico (Pesaro et al., 2005). De acordo com o estudo Grampian Region Early Anistreplase Trial (GREAT) a cada minuto que se retarda a instituição da terapia de reperfusão, reduz-se a expectativa de vida em 11 dias (Rawles et al., 1997). Outra modalidade de reperfusão no processo isquêmico agudo é a intervenção coronária percutânea (ICP) primária. A ICP primária é a utilização do cateter balão, com ou sem implante de *stent* coronário, sem o uso prévio de fibrinolítico, com o objetivo de restabelecer o fluxo coronário anterógrado de maneira mecânica. Inúmeras séries

consecutivas, registro e ensaios randomizados comprovaram as vantagens desse método, se comparado a fibrinólise (Keeley et al., 2003; Huynh et al., 2009).

Clinicamente, a reperfusão do miocárdio isquêmico é crucial para salvar as células do miocárdio da morte celular isquêmica. No entanto, a própria reperfusão induz vários efeitos deletérios sobre o miocárdio isquêmico, processo denominado Lesão de Reperfusão (LR) (Yellon et al., 2007). A LR é descrita pelas alterações funcionais e estruturais que se tornam aparentes durante o restabelecimento do fluxo sanguíneo após um período de isquemia. Devido ao fato de, inicialmente, ocorrer à interrupção da passagem de sangue pela coronária, diminuindo o oxigênio e nutrientes para o miocárdio, mudando o metabolismo celular com consequente acúmulo de lactato, depleção de ATP, sobrecarga Na^+ e Ca^{2+} e inibição da função contrátil do miocárdio (Figura 1) (Braunwald et al., 1985).

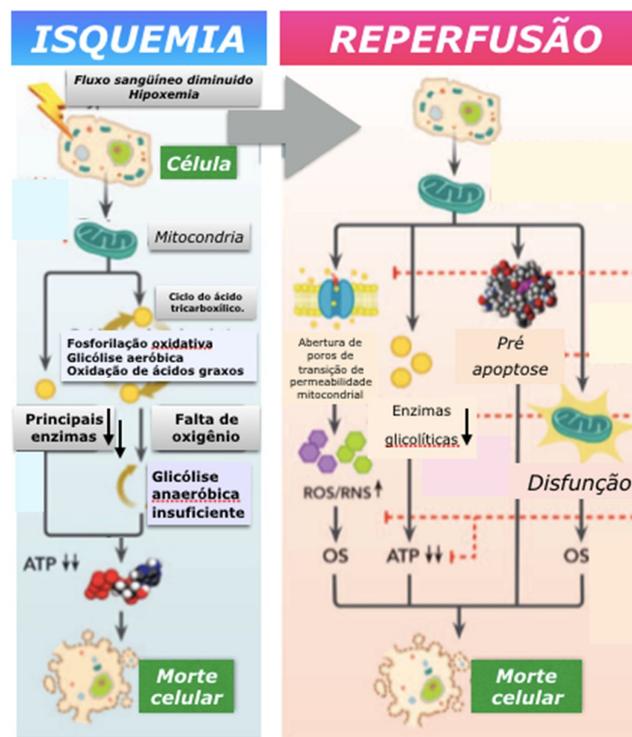


Figura 01: Impacto das células estaminais mesenquimais em vias de lesões isquemia-reperfusão. Adaptado de Monsel et al., 2014.

A reperfusão restabelece o fluxo coronário com a passagem de sangue irrigando e oxigenando o músculo infartado, o que resulta na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) devido a diversos mecanismos como o extravasamento

de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial, a ativação da xantina oxidase, a abertura de poros de transição de permeabilidade mitocondrial e a sobrecarga de Ca^2 intracelular, induzindo a morte de cardiomiócitos independentemente do miocárdio isquêmico, ocorrendo lesão peri-infarto (Bodi et al., 2008). A LR pode ser classificada em quatro tipos de lesões: Miocárdio atordoado; Arritmia induzida por Reperusão; Lesão de reperusão microvascular (fenômeno não-refluxo ou obstrução microvascular); e Lesão de reperusão letal (Kloner e Przyklenk, 1993).

A reperusão afeta uma porção maior do ventrículo esquerdo do que o IAM isolado e a LR pode atuar como um determinante independente do remodelamento cardíaco para além da dimensão da área infartada. Hashmie e Al-Salam (2015), utilizando um modelo experimental de IAM, sugeriram que o dano no miocárdio ocorre principalmente devido à necrose isquêmica que acompanha a inflamação, enquanto que a apoptose é o principal mecanismo de morte celular em LR em adição à necrose isquêmica limitada. Os autores ainda mostraram que os dois processos de lesão de cardiomiócitos são de fato muito distintos e o microambiente do miocárdio determina as funções específicas de moléculas e enzimas que são parte da sua patogênese.

No processo de isquemia e reperusão ocorre um aumento do nível de norepinefrina no coração, o que inicialmente fornece suporte para o miocárdio com disfunção sistólica e diastólica (Cohn et al., 1984). A médio e longo prazo a ativação contínua de sistemas neurohormonais torna-se deletéria para o coração, levando à: vasoconstrição excessiva, aumentando assim a pós-carga cardíaca, expansão do volume circulante e continuação da deterioração da função cardíaca com o processo de remodelamento do ventrículo esquerdo e instalando o quadro clínico de Insuficiência cardíaca (Ferrari et al., 1998).

1.2 REMODELAMENTO CARDÍACO

O remodelamento cardíaco (RC) é um conjunto de alterações intra e extra cardíacas que se manifestam clinicamente como modificações de tamanho, massa, geometria e função do coração, em resposta a determinado dano miocárdico, agudo ou crônico (Cohn et al., 2000). A causa mais comum de RC e consequente insuficiência cardíaca (IC) é o IAM (Weisman et al., 1985). O processo de RC pode ser reversível, desde que a causa possa ser suprimida ou atenuada, esse processo

envolve alterações genéticas, moleculares e celulares que atuam sobre miócitos e o interstício cardíaco (Rumberger et al., 1993). Quando há dano miocárdico a fisiopatologia do RC é explicada pela tendência de hipertrofia do miócito, deslizamento do colágeno, fibrose reativa e reparativa, alterações do citoesqueleto e a apoptose que modulam o tamanho, geometria e a rigidez do coração, levando ao remodelamento cardíaco e posterior IC (Dhalla et al., 1996).

Um dos resultados do processo isquêmico no miocárdio é a diminuição dos números de miócitos, onde os miócitos sobreviventes se tornam alongados ou hipertrofiados como parte de um processo compensatório inicial (remodelamento adaptativo) para manter o débito cardíaco e principalmente a perfusão cerebral após a perda de tecido contrátil, o que provoca aumento da espessura da parede ventricular (Francis et al., 1992). Nesse mesmo contexto, a degradação do colágeno é explicada pelo fato do miocárdio ser constituído por miócitos amarrados e apoiados por uma rede de tecido conjuntivo composta em grande parte de colágeno fibrilar, que é sintetizada e degradada por fibroblastos intersticiais. A colagenase miocárdica é considerada uma importante enzima inativa presente no ventrículo (Volders et al., 1993). A ativação desta enzima após a lesão miocárdica contribui para o aumento da dimensão da câmara em resposta à pressão, a qual provoca distensão do músculo cardíaco, o que poderá causar deslizamento de miócitos, que alguns autores consideram um contribuinte para o remodelamento da câmara (Olivetti et al., 1990). O remodelamento do ventrículo esquerdo é progressivo e não há dados para indicar com precisão quando ocorre a transição do possível remodelamento adaptativo para o mal-adaptativo (Gaudron et al., 1993). A figura 02 representa a evolução do remodelamento cardíaco, sendo que a fase inicial da lesão isquêmica com ou sem reperfusão é chamada de fase inflamatória inicial. Na fase de recuperação há hipertrofia de miócitos viáveis e adelgaçamento da parede isquêmica e na fase tardia do remodelamento há aumento global da câmara cardíaca com diminuição de sua força de contração (Yan et al., 2012).

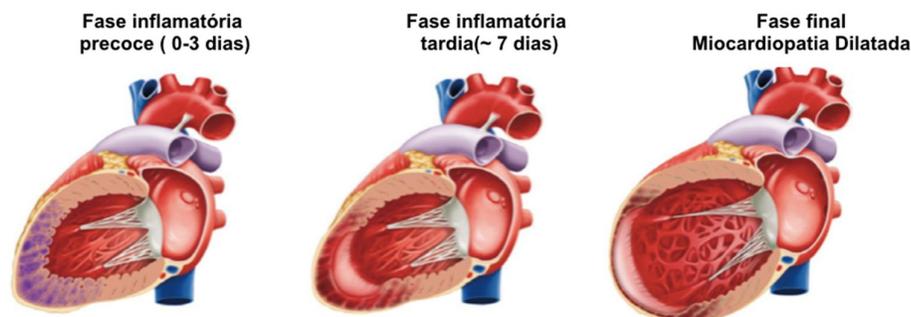


Figura 02: Evolução do remodelamento cardíaco, adaptado de Yan et al., 2012.

1.3 NANOPARTÍCULAS DE OURO

Nas últimas décadas, as nanopartículas (NPs) inorgânicas vêm demonstrando funcionalidade e propriedades biológicas, físicas, químicas significativamente distintas e instigou diferentes grupos de pesquisa para a investigação sobre a sua utilização devido à sua surpreendente gama de aplicações (Bhattacharya et al., 2008). As nanopartículas com diâmetro entre 1 e 100 nanômetros tem sido utilizadas para o diagnóstico; entrega de moléculas, e de engenharia de tecidos, e estudos com nanopartículas tem sido considerado fronteira em pesquisa biomédica (Durán et al., 1999).

Devido as suas dimensões nanométricas, as NPs podem facilmente atravessar a membrana celular e alcançar organelas cruciais, como as mitocôndrias, o reticulo endoplasmático e o núcleo celular (Daniel et al., 2004). A utilização de nanopartículas, em especial neste estudo, as de ouro (NPAu), suscitam inúmeros interesses para as aplicações biomédicas devido as suas propriedades de atração, a sua facilidade de síntese, caracterização e funcionalidade na superfície. Além de que, investigações recentes estão demonstrando promissoras aplicações da NPAu como terapêutica em situações diversas (Wong et al., 2013).

A utilização das NPs no campo biomédico tem demonstrado interesse devido as suas características como: estabilidade química; facilidade de síntese e processo de fabricação; biocompatibilidade genuína e não interferência com outros biomateriais; bioconjugação de superfície com sondas moleculares, propriedades ópticas marcantes e baixa citotoxicidade (Katz et al., 2004). As aplicações biomédicas das NPAu têm aumentado consideravelmente devido a sua baixa citotoxicidade e alta capacidade de interação às células, com isto, são utilizadas

cl clinicamente para melhorar o potencial das drogas, alterando a farmacocinética, biodistribuição e absorção celular. Os efeitos atribuídos às NPAu estão associados às propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, porém o mecanismo de ação da NPAu ainda está pouco esclarecido (Chen et al., 2013). Sabe-se que o ouro possui propriedades primordialmente anti-inflamatórias, com supressão da produção mRNA para IL-6 e TNF- α , citocinas pró-inflamatórias, e com capacidade de redução ERO, a NPAu atua no processo de detoxificação a partir da glutathione - GSH (Khan et al., 2013; Paula et al., 2015).

Estudos prévios demonstraram que a associação de NPAu com drogas ou técnicas de tratamento pode ser positiva. Em 2015 nosso grupo demonstrou que a associação de NPAu associada N-acetilcisteína reduz a resposta inflamatória sistêmica induzida por carragenina (Paula et al., 2015) e foi também demonstrado que o uso da NPAu sob a ação de iontoforese e fonoforese, respectivamente, promovem uma redução dos parâmetros de estresse oxidativo mediados por processos inflamatórios induzidos por danos musculares (Zortea et al., 2015).

1.4 SESTAMIBI

O SESTAMIBI-^{99m}Tc é um complexo catiônico, lipofílico, que é captado pelos miócitos na proporção do fluxo sanguíneo do miocárdio. É amplamente empregado na medicina nuclear, especialmente para avaliação da função do miocárdio (Carlsson, 1995).

De acordo com a Diretriz da Sociedade Brasileira de Cardiologia sobre medicina nuclear, uma vez administrado por via venosa, o SESTAMIBI é captado pelo miócito em processo de difusão passiva dependente do potencial elétrico transmembrana, concentrando-se predominantemente nas mitocôndrias. Aproximadamente 90% do SESTAMIBI intracelular está associado com a mitocôndria como um complexo catiônico livre (Muradian et al., 1992; Papadopoulos et al., 1994). Portanto, a nossa proposta é que esta molécula possa ser empregada como um agente condutor de terapias em tecido/organela específica, amplificando efeito terapêutico e minimizando efeito colateral. A associação do potencial antiinflamatório das nanopartículas de ouro com a capacidade de direcionar a terapia para cardiomiócitos e mitocôndrias torna a conjugação do sestamibi com

nanopartículas de ouro especialmente interessante no contexto da cardiologia (Wackers et al., 1989).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar química e biologicamente a avaliação da toxicidade da administração de nanopartículas de ouro (NPAu) ligada ao sestamibi sobre a lesão de reperfusão após isquemia cardíaca.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar quimicamente a associação NPAu ligado ao sestamibi.
2. Definir uma dose segura de NPAu+sestamibi administrada intraventricularmente após o IAM.
3. Investigar as possíveis alterações de toxicidade cardíaca, hepática e renal pela administração intraventricular de NPAu+sestamibi após o IAM.
4. Investigar o perfil histopatológico cardíaco após a isquemia/reperfusão frente à administração NPAu associada ao sestamibi.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AMOSTRA

Quarenta e oito ratos (*Rattus norvegicus albinus*) da linhagem Wistar (90 dias de idade, cerca de 300g), adquiridos pela Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) foram utilizados e randomicamente divididos em 4 grupos experimentais (n=12): IR + veículo; IR + 0,3 µg/kg de NPAu/sestamibi; IR + 0,7 µg /kg de NPAu/sestamibi; IR + 1,0 µg/kg de NPAu/sestamibi. O número amostral foi calculado para detectar um aumento de 2 desvios padrões na média da AST, ALT e creatinina, conforme Barathmanikanth et al. (2010) considerando um alfa de 5% e um poder de 80%. O valor encontrado foi dobrado pela expectativa de morte cirúrgica, estimada em 50%. Após 24 horas do procedimento de reperfusão os animais foram eutanasiados e o sangue e o tecido cardíaco (área infartada e área não-infartada) foram coletados para posteriores análises.

Todos os procedimentos foram realizados conforme a Lei nº 11.794/08 (Outubro/2008) e Resoluções Normativas 13 e 30, do CONCEA e aprovados pelo Comitê de Ética do HCPA sob protocolo 16-0536. Os animais foram mantidos na Unidade de Experimentação Animal, em um alojamento específico para a espécie, com temperatura controlada ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade relativa do ar em 40-60%, ciclo de luz de 12 h claro/12 h escuro, sistema de exaustão de ar, em caixas moradia com no mínimo 2 e no máximo 4 animais e passaram por um período de aclimação/quarentena de 15 dias antes do início dos procedimentos.

3.2 DESENHO EXPERIMENTAL



Figura 03 – Desenho experimental. Os animais foram submetidos a uma isquemia de 30 minutos seguidos de reperfusão de 24 horas. Os animais Sham receberam o processo cirúrgico, mas não a isquemia.

3.3 PROTOCOLO DE ISQUEMIA-REPERFUSÃO

O infarto agudo do miocárdio foi induzido de acordo com Xu et al. (2014). Inicialmente os animais foram anestesiados com Xilasina (5 mg/Kg, i.p.) e cetamina (50 mg/Kg, i.p.), e tiveram o tórax tricotomizado em ventilação mecânica numa frequência de 60 bpm e volume corrente de 1,5 mL (Harvard ventilator, model 683). A ventilação foi suplementada com isoflurano 2-3% de forma a manter o animal inconsciente ao longo da cirurgia. Uma incisão foi realizada no hemitorax esquerdo, com exposição da musculatura intercostal. Bupivacaina (1mg/Kg) foi injetada na musculatura intercostal antes da incisão no segundo espaço intercostal (*ictus cordis*), sem exteriorização do coração. A artéria coronária descendente anterior foi então ocluída aproximadamente a 2 mm da sua origem com fio mononylon 6.0. Após 30 minutos, a oclusão foi desfeita, permitindo a reperfusão coronária. Após o final do procedimento, a cavidade torácica foi fechada e suturada com fio cirúrgico mononylon 5.0. Os animais considerados do grupo Sham foram expostos aos mesmos procedimentos, exceto a oclusão da artéria coronária. Antes da toracografia, o pulmão dos animais foi expandido por fechamento da exaustão do ventilador mecânico para estabelecimento da pressão intratorácica. Após o procedimento cirúrgico todos os animais receberam analgésicos (tramadol 5 mg/Kg, i.p., 12/12 h em associação com dipirona 250 mg/kg, i.p., 12/12h ambos por 24 horas) para redução da dor pós-cirúrgica. O protocolo tem duração limitada em 24 horas e sinais

de angústia respiratória incompatível com os níveis esperados foram usados para eutanásia prévia para evitar sofrimento dos animais.

3.4 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO

Nanopartículas de ouro foram sintetizadas conforme descrito por Turkevich e colaboradores (1951) com algumas modificações. Ácido cloroáurico (HAuCl_4) foi adquirido junto a Sigma-Aldrich (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) e Citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), um agente redutor e estabilizante, foi adquirido com a Nuclear (Nuclear, Diadema, SP, Brasil). O tamanho das nanopartículas de ouro foi controlado usando uma concentração adequada de Citrato de sódio, determinada previamente. Em resumo, 35 μL de HAuCl_4 foram diluídos para 100 mL, resultando numa solução 0.50 mM. Esta solução foi transferida para um balão de fundo redondo acoplado a um condensador. O sistema foi aquecido a 90 °C sob vigorosa agitação magnética. Então, 5 mL de solução de citrato de sódio 0,30 $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ foi adicionada rapidamente e o sistema, mantido sob refluxo e agitação magnética por 15 minutos. Finalmente, a solução foi resfriada até a temperatura ambiente. Em tempo, todas as vidrarias utilizadas foram previamente lavadas com água régia (HCl/HNO_3 3:1) e rinsadas com água ultrapura.

As sínteses das nanopartículas de ouro e demais reações foram acompanhadas por espectroscopia de UV-VIS, via monitoramento da banda de superfície de plasmon ressonante (SPR – surface plasmon resonant), utilizando-se um espectrofotômetro de UV-VIS da LGS 53 Bel Photonics, Brasil. O tamanho e forma (geometria) das nanopartículas foram estimados por duas técnicas distintas, a saber: microscopia de transmissão de elétrons (TEM), com auxílio de um microscópio de transmissão de elétrons marca JEOL, modelo Titan 300 kV. Nestes casos, a amostra foi preparada diluindo-se a solução de NPAus até a absorção no máximo comprimento de onda apresentar valores abaixo de 0.1. Em seguida, esta solução foi mantida sob agitação ultrassônica por 10 minutos para evitar qualquer possível aglomeração de partículas e então, 5 μL foram depositados sobre um porta-amostras de cobre e mantida em dessecador por 24 h antes da análise. Em tempo, a caracterização por Microscopia de Transmissão de Elétrons foi realizada Centro de Investigación en Química Aplicada - CIQA, México. O tamanho do cristalito (de partículas) também foi avaliado por Difractometria de Raios-X, com auxílio de um

Difratômetro de Raios-X da SHIMADZU, modelo XRD-6000 empregando radiação monocromatizada de Cu-K α ($\lambda = 0.154056$ nm), operado a 30kV e 30 mA. A velocidade de varredura foi de 2°/min., com leitura de 2 θ variando no intervalo de 10 a 80°. Neste caso, o preparo da amostra foi efetuado da seguinte maneira: uma solução de NPAus recém preparada foi previamente concentrada por centrifugação a 14.000 rpm durante 15 minutos e a 15°C. O sobrenadante foi removido cuidadosamente e o concentrado de NPAus foi depositado uniformemente sobre um porta-amostras de vidro. O sistema foi deixado secar lentamente antes da leitura direta no difratômetro.

3.5 ADMINISTRAÇÃO DE NPAU/SESTAMIBI

A abordagem aqui empregada é inovadora e, portanto, não há definição na literatura de uma dose de NPAu/sestamibi a ser ministrada. Estudos prévios têm utilizado doses variadas de NPAu girando em torno de 1 a 2,5 mg/kg (sem o sestamibi) injetadas sistemicamente e que não apresentam efeitos tóxicos. Por se tratar de administração *in situ*, optamos em utilizar concentrações em escala bem menores para evitar riscos de toxicidades. Em relação ao sestamibi, de acordo com o Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (Ipen, 2016), testes de tolerância toxicológica realizado em camundongos não provocaram reação adversa no organismo dos animais numa dose equivalente a 1000 vezes superior à maior dose administrada em adultos humano de 70 kg, no período de observação de 72 horas.

Com base nesses pressupostos a NPAu foi administrada em associação ao sestamibi em uma única dose, nas concentrações de 0,5,1,3 e 3,0 μ g/kg no início da reperfusão (30 minutos após o bloqueio da artéria descendente anterior). O volume total administrado foi de 0,5 mL durante um tempo de 30 segundos.

3.6 CARACTERIZAÇÃO DE NPAU E 2-METOXI-ISOBUTIL-ISONITRILA (MIBI)

A associação ou modificação de nanopartículas de ouro foi efetuada primeiramente pela reação direta entre estas e o precursor Cu(MIBI)₄. Neste caso, preparou-se uma solução de NPAu, conforme descrito no item 1.1, onde 10 mL desta solução foram centrifugados a 14.000 rpm por 15 min. e a 15 °C. O sobrenadante removido e o produto concentrado lavado com água ultrapura. Este

procedimento foi realizado 3 X no sentido de remover o excesso de Citrato de sódio, que é o agente estabilizante das NPAu. Imediatamente após, procedeu-se a reação com o tetrafluorborato tetramibi cuproso, que foi previamente diluído em 1 mL de água ultrapura. Estes procedimentos foram executados com os devidos cuidados para evitar contato dos reagentes com O₂(g). Assim, utilizaram-se frascos especiais, com septo de borracha e sob vácuo. A água empregada na diluição e a solução de NPAus foram previamente desoxigenadas borbulhando-se (purgando-se) gás Ar por 10 min. A reação NPAu / MIBI se deu pela adição de pequenas alíquotas de solução de tetrafluorborato tetramibi cuproso (1mg/mL) à solução de NPAu e monitorando-se as possíveis mudanças no espectro eletrônico da solução resultante, cujos resultados são apresentados a seguir.

3.7 MARCADORES DE DANO HEPÁTICO, RENAL E CARDÍACO

Creatinina, uréia, aminotransferase de aspartato (AST) e aminotransferase de alanina (ALT) foram determinados no plasma utilizando um kit específico obtido a partir Labtest Diagnóstica SA, Brasil. As leituras foram feitas a partir de um método cinético de atividade enzimática de acordo com as instruções técnicas e os resultados serão expressos em mmol/dL. A troponina I foi analisada a partir de sangue venoso coletado do plexo retro orbital (2 mL) com o auxílio de capilares heparinizados 24 horas após a isquemia. O sangue foi centrifugado e o plasma foi encaminhado ao Serviço de Patologia Clínica do HCPA para a dosagem da troponina I, conforme rotina.

3.8 MARCADORES HISTOPATOLÓGICOS

O ventrículo esquerdo foi seccionado de forma transversal e uma porção mediana foi submersa e fixada durante 12 horas em formalina 10%. Após a fixação, o material foi processado em histotécnico automatizado passando por banhos de álcool em concentração crescente (70, 80 e 100%) e posteriormente diafanizado em xilol. O material então ficou submerso em parafina líquida a 60° C, sendo em seguida, emblocado e submetido a cortes histológicos com 3µm de espessura em micrótomo rotativo. Foram confeccionadas 2 lâminas de cada bloco, coradas pelo método de hematoxilina e eosina (HE) e pelo vermelho picrosirius. A quantificação

da intensidade da coloração vermelha, indicativa de fibras de colágeno, foi avaliada com software ImageJ. A quantidade de coloração vermelha foi expressa de forma relativa à área total da imagem, descontando-se as áreas sem tecido.

3.9 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Os dados de marcadores de danos hepático, renal e cardíacos foram expressos em média e desvio padrão e analisados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA) one-way, seguido pelo teste post Dunett. O nível de significância estabelecido para o teste estatístico foi de $p < 0,05$. O GraphPad *Prism versão 7.0* foi utilizado como pacote estatístico.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A doença isquêmica do coração é a principal causa de morte e incapacidade em todo o mundo. Assim, novas estratégias de tratamento são necessárias para proteger o coração dos efeitos prejudiciais da lesão aguda de Isquemia / Reperfusão, de modo a reduzir a lesão miocárdica, preservar a função sistólica do ventrículo esquerdo e prevenir o aparecimento da insuficiência cardíaca. Nesse contexto, caracterizar modelos experimentais que testem a eficácia de nanopartículas em sistemas biológicos é de extrema relevância e contribui para o avanço científico nesse campo do conhecimento. Nesse estudo, estabelecemos e caracterizamos um modelo de administração de nanopartículas de ouro ligadas ao sestamibi.

4.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA ASSOCIAÇÃO ENTRE NPAu E MIBI

Espectroscopia de UV-VIS: A Figura 4 corresponde ao espectro eletrônico durante os 5 primeiros minutos de síntese de NPAu em solução, preparadas pelo método de Turkevich (1951), ou seja, usando Citrato de sódio como agente redutor e estabilizante.

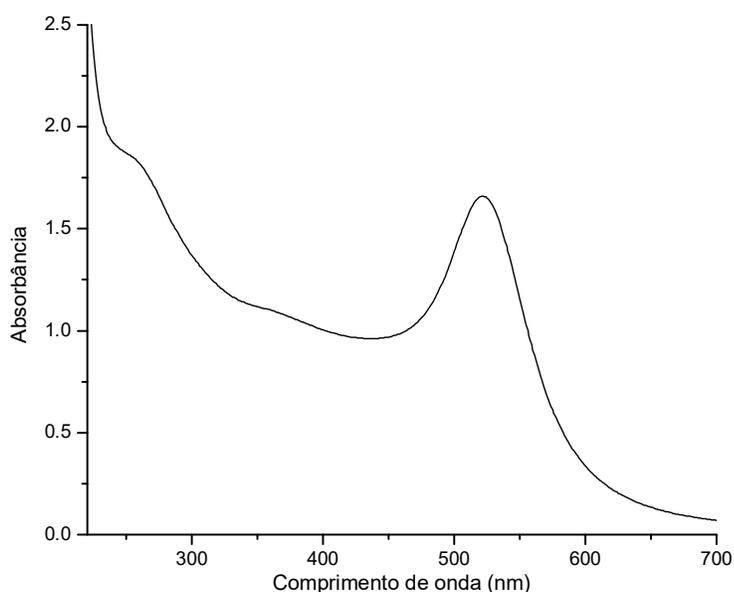


Figura 04: Espectro de UV-VIS de uma solução aquosa de NPAu 70 mg/L.

Como se pode observar, verifica-se a presença de uma banda em forma de ombro, na região do ultravioleta, com comprimento de onda cerca de 254 nm. Esta banda é atribuída à presença de íons ouro (Au^{3+}) em solução. À medida que a reação se processa, constata-se o surgimento de uma banda com absorção máxima no comprimento de onda de 525 nm, que é uma transição eletrônica característica de superfície de plasmon ressonante (banda SPR), também denominada banda de ressonância plasmônica. Este tipo de espectro é típico de nanopartículas de ouro esféricas, com diâmetro médio de 20 nm (Toderas et al., 2009). É sabido que metais nobres nanoparticulados exibem o fenômeno de ressonância plasmônica de superfície, que consiste numa oscilação da nuvem eletrônica na superfície da nanopartícula metálica ocasionada pela interação da luz com elétrons do orbital d.

Adicionalmente, o tamanho da nanopartícula faz com que a banda eletrônica ressonante tenha um deslocamento para comprimentos de ondas maiores. Este efeito pode ser usado para testar estabilidade das nanopartículas em solução, como demonstrado por Sun e colaboradores (2002). Esta banda também é sensível a geometria e do tamanho das nanopartículas. As interações com espécies químicas em solução também podem causar desvios batocrômicos. Por isso, é uma técnica amplamente utilizada no estudo de nanopartículas associadas à fármacos. Por exemplo, um deslocamento da banda para regiões de maior comprimento de onda pode ser indicativo de nanopartículas maiores ou da interação destas com biomoléculas contendo grupos funcionais, tais como: $-\text{COOH}$ (Grupo Carboxila), $-\text{SH}$ (Grupo das pontes de Sulfeto), $-\text{NH}_2$ (Grupo dos Nitritos), entre outros (Paula et al., 2015).

No sentido de avaliar possíveis interações entre NPAu e o ligante 2-metoxi-isobutil-isonitrila, alíquotas de solução de MIBI foram adicionadas sucessivamente a uma solução de NPAu e os espectros de UV-VIS, registrados. Na Figura 5 pode-se observar o efeito da adição do MIBI sobre as NPAu. O primeiro espectro corresponde a solução de NPAu pura. O segundo espectro foi registrado 1 min. Após adição de 10 uL de solução de MIBI (linha vermelha). O terceiro espectro (linha azul), 1 min. após a adição de mais 10 uL de MIBI a solução anterior. Finalmente, o último espectro (linha azul), um minuto após a adição de mais 10 uL de solução de MIBI, ou seja, solução de NPAu contendo 30 uL de solução MIBI. Utilizou-se solução 1mg/L de MIBI.

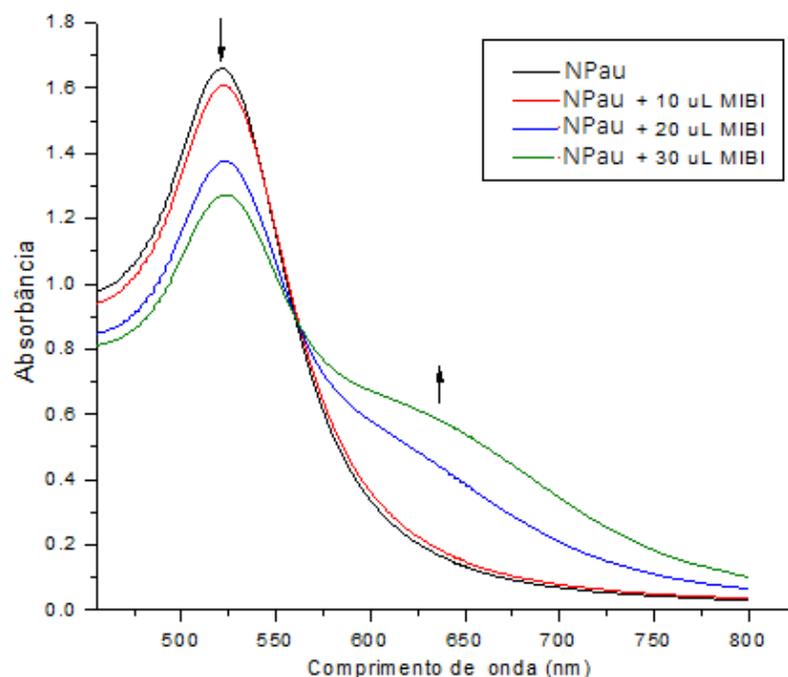


Figura 05: Espectros de UV-VIS para solução de NPAu após adição de diferentes quantidades de solução de MIBI 10 mg/L.

A adição de sucessivas alíquotas de MIBI conduz a uma diminuição na intensidade da banda de SPR, situada em $\lambda_{\text{max}} = 522$ nm. Ainda, verifica-se que à medida que esta diminui, uma nova banda surge na região de 630 nm. Um ponto isobéstico em 562 nm é observado. Este deslocamento batocrômico, isto é, para região de maior comprimento de onda é típico de interação de nanopartículas com biomoléculas. Neste caso, é provável que a interação se dê pelo grupo isonitrila ($-\text{N}\equiv\text{C}$) do ligante MIBI.

No sentido de avaliar o efeito da temperatura na velocidade da reação entre MIBI e NPAus, outro experimento foi realizado. Neste caso, uma solução de NPAus foi aquecida a 80 °C, seguido da adição de uma alíquota de 50 µL de MIBI (10 mg/L). O espectro eletrônico foi registrado após 1 minuto.

Como pode ser visto na Figura 6, a banda de SPR em 520 nm é deslocada para cerca de 540 nm e uma nova banda, mais intensa e alargada surge em 712 nm. Isto demonstra de forma inequívoca a forte interação entre as NPAu e o ligante MIBI. O efeito da temperatura pode ser facilmente explicado. O MIBI originalmente está complexado a um centro metálico de Cu, na forma de

[Cu(MIBI)₄]BF₄. Sob aquecimento, a ruptura da ligação Cu-MIBI é facilitada, permitindo que após liberação, uma nova “ligação” se forme com as NPAus.

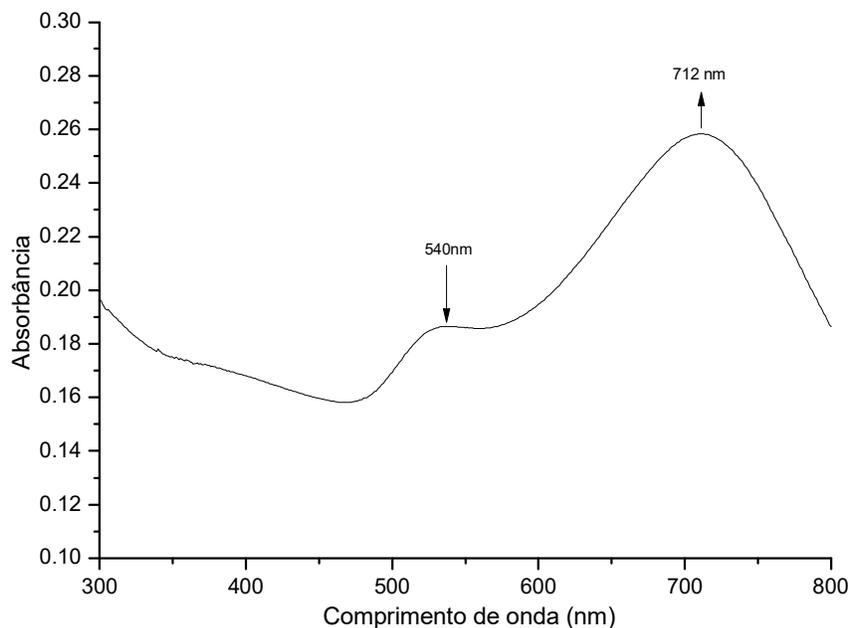


Figura 06: Espectro eletrônico de NPAu após adição de 50 uL de MIBI 10 mg/L.

Difratometria de Raios-X: No sentido de determinar o tamanho de cristalito das nanopartículas empregadas neste estudo, uma amostra de NPAu foi submetida a ensaio de difratometria de raios-X. O difratograma, registrado no intervalo de $2\Theta = 20$ a 80° , apresenta os picos em $2\Theta = 37,77^\circ$, $43,97^\circ$, $64,27^\circ$ e $77,33^\circ$, que correspondem aos planos cristalinos (1,1,1); (2,0,0); (2,2,0) e (3,1,1), respectivamente. Estes sinais estão em concordância com os valores descritos no JCPDS Card Number: 4-0784. O cálculo do tamanho do cristalito para estas nanopartículas empregando a equação de Scherrer (equação 1) é mostrado a seguir (Aromal e Green, 2012):

Equação 1

Onde:

d = tamanho médio do cristalito, em nm.

K = fator de forma, 0,9.

λ = comprimento de onda do raio-x Cu-K α , 0,154056 nm.

β = largura a meia altura (FWHM), em radianos.

θ = ângulo de Bragg, onde se encontra o pico.

$$d = \frac{K \cdot \lambda}{\beta \cdot \cos \theta}$$

Aplicando-se a equação de Scherrer, obtém-se um valor de 12 nm para o diâmetro médio do cristalito destas nanopartículas. Este valor está em boa concordância com o observado nas análises de microscopia de transmissão de elétrons, cuja micrografia é apresentada na Figura 4. Pode-se observar na respectiva micrografia, que a nanopartícula de ouro apresenta geometria esférica. O valor de 10 nm é inferior ao obtido pelo previsto nas análises de UV-VIS. Contudo, está em boa concordância com o obtido na análise de DRX.

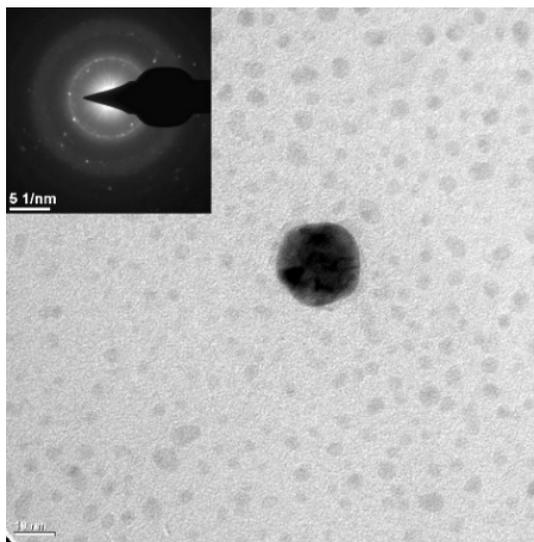


Figura 07: Micrografia de uma nanopartícula de ouro ligadas ao sestamibi obtida por microscopia de transmissão de elétrons (300 kV).

4.2 EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO INTRAVENTRICULAR DE NAPU+MIBI SOBRE A TOXICIDADE CARDÍACA, HEPÁTICA E RENAL PELA ADMINISTRAÇÃO INTRAVENTRICULAR DE NAPU+SESTAMIBI APÓS O IAM.

Como observado na Tabela 1 não houve alterações significativas nos parâmetros de toxicidade cardíaca, hepática e renal nos animais com IAM e expostos à diferentes concentrações de NP Au e MIBI. Estudos prévios observaram em animais não-infartados valores bem menores, o que sugere uma alteração esperada induzida pelo IAM.

Variáveis	MIBI (média±DP)	MIBI+0,5 µg/kg (média±DP)	MIBI+1,3 µg/kg (média±DP)	MIBI+3,0 µg/kg (média±DP)
cTnI (ug/mL)	9,56± 8,06	16,78± 13,20	19,93± 12,02	12,29± 11,46
AST (U/L)	281,88± 255,91	389,17± 299,41	247,75± 217,64	322,55± 244,83
ALT (U/L)	203,50± 182,81	268,00± 258,57	293,25± 248,31	268,73± 263,78
AST/ALT	4,79± 5,38	4,76± 4,64	3,60± 3,90	5,13± 5,01
Ureia (mg/dL)	44,75± 10,79	36,50± 6,98	42,63± 5,48	44,64± 9,04
Creatinina (mg/dL)	0,36± 0,16	0,35 ± 0,02	0,41± 0,09	0,40 ± 0,07
Ureia/Crea tinina	138,69± 49,38	103,76± 17,90	107,30± 17,56	112,88± 17,85

Tabela 1: Marcadores de toxicidade cardíaca, hepática e renal pela administração intraventricular de NAPu+sestamibi após o IAM. Dados são apresentados em média e desvio padrão e a análise de variância de uma via foi realizada para detectar as possíveis diferenças entre os grupos versus controle (MIBI). cTnI – troponina I, AST – aspartato aminotransferase, ALT – alanina aminotransferase.

O uso de ensaios cada vez mais sensíveis para as formas cardíacas de troponinas revolucionou o atendimento de pacientes que apresentaram infarto agudo do miocárdio (Thygesen et al., 2012). A detecção da presença de necrose miocárdica em pacientes com dor torácica depende da capacidade de quantificar com precisão a extensão do dano ao miocárdio (Mueller et al., 2014). A troponina cardíaca I e T são proteínas chaves como marcadores sensíveis de necrose miocárdica. O complexo de troponinas cardíacas é imobilizado no filamento fino do complexo contrátil no filamento e desempenha um papel crítico na regulação do acoplamento excitação-contração no coração (Thygesen et al., 2010). No IAM, troponinas são liberadas do miocárdio necrótico tanto como proteínas intactas como produtos de degradação. A detecção de troponina no sangue periférico indica dano dos cardiomiócitos (Mueller et al., 2014). A elevação de troponina T ocorre em até três horas após o evento isquêmico e permanece na circulação por até 10 ou 14 dias (Newby et al., 1988). A troponina I cardíaca é altamente específica para o tecido miocárdico, não sendo detectável no sangue de pessoas saudáveis e apresenta um aumento proporcional acima dos valores limite nos casos de IAM podendo permanecer elevada de 7 a 10 dias após o episódio agudo (Antman et al., 1996).

No presente estudo observou-se que a utilização de NPau associada ao sestamibi não promoveu mudanças significativas nos níveis de troponina, independente da dose utilizada nos grupos, o que demonstrou que não houve toxicidade do composto utilizado. Sun e colaboradores (2017) realizaram um estudo para avaliar o uso de Sulfato de Hidrogênio (H_2S) na proteção do dano de isquemia e reperfusão em um modelo experimental semelhante ao do nosso estudo, e nesse trabalho pode observar aumento de troponina similar ao nosso, compatível com o quadro do IAM induzido. Yang e colaboradores (2017) realizaram um estudo para avaliação de toxicidade e biodistribuição de NPau, onde NPau foi administrada via intravenosa por um período de dois meses em ratos e não foram observados sinais de toxicidade e alteração cardíaca.

A hepatotoxicidade causada por drogas é uma manifestação das alterações da atividade hepática que se manifesta desde a elevação assintomática dos parâmetros bioquímicos até a insuficiência hepática aguda e pode ser classificada como: hepatite, que é a lesão hepatocelular com elevação da alanina aminotransferase (ALT); colestática, com elevação da fosfatase alcalina (FA); ou mista, a qual eleva ambos os parâmetros (Navarro et al., 2006).

A ALT catalisa a transaminação reversível de alanina e α -cetoglutarato em piruvato e glutamato. Esta enzima requer fosfato de piridoxal como fosfato e é considerada hepato-específica porque um significativo aumento em sua atividade sérica somente é observado na degeneração ou necrose hepatocelular. O aumento da ALT está relacionado com o número de células envolvidas, ou seja, com a extensão, e não com a gravidade da lesão. Na realidade, mesmo uma lesão que não cause morte celular, pode ser suficiente para que ocorra a liberação de ALT na corrente sangüínea. A AST catalisa a transaminação de aspartato e α -cetoglutarato em oxalacetato e glutamato. Tem como cofator o piridoxal-fosfato. Existe em muitos tecidos como duas isoformas, no citosol e na mitocôndria, sendo mais abundante no fígado e nos músculos. Seu uso é como indicador de danos nesses tecidos (Gella, 1994). Cardiomiopatias diversas podem causar este efeito, assim como o infarto do miocárdio. Quando estiver presente, congestão hepática por problema cardíaco, a enzima provavelmente está elevada devido ao fígado congesto (Bush et al., 1991).

Um dos alvos de investigação deste trabalho foi caracterizar se o uso de NPau associado ao sestamibi predispõe à ocorrência de hepatotoxicidade hepatocelular e se há uma relação dose dependente para o aumento da enzima

hepática. Como observado não houve alteração significativa entre os grupos analisados, mantendo a alteração enzimática compatível com o quadro de IAM. Lipka e colaboradores (2010) sugerem que esses efeitos decorrem do fato das NPs não apresentarem acúmulo no fígado, assim como no baço, pulmões e rins e terem um período de depuração e eliminação corporal pelas fezes e urina em um período de 24 horas.

Uma das funções mais importantes do rim são a filtração e excreção de resíduos nitrogenados do sangue. As medidas de uréia e creatinina servem como indicadores de diminuição da função renal indicativa da diminuição da depuração desses resíduos. Nosso estudo não demonstrou alteração da função renal nos grupos estudados, independente da dose utilizada, o que demonstra que até a dose de 3,0µg/kg de nanopartícula de ouro com sestamibi não há sinais de nefrotoxicidade.

A disfunção renal é conhecida como um dos principais motivos de elevação de troponina além do infarto agudo do miocárdio (Roffi et al., 2016), e nosso estudo mostrou que não houve comprometimento da função renal em todos os grupos avaliados, confirmando que a alteração de troponina não teve interferência de disfunção renal. Saleh et al. (2016) realizaram um estudo experimental administrando NPAu intraperitoneal (30ppb) por 14 dias consecutivos em hamsters e também não foi observado alteração nos marcadores de função renal.

4.3 PERFIL HISTOPATOLÓGICO CARDÍACO APÓS A ISQUEMIA/REPERFUSÃO FRENTE À ADMINISTRAÇÃO NPAU ASSOCIADA AO MIBI

Os resultados observados na Figura 08A demonstram a presença de fibras de colágeno distribuídas no tecido (em vermelho), expresso de forma relativa à área total da imagem. Adicionalmente, a Figura 08B mostra que as diferentes doses de NPAu não promoveram qualquer alteração no percentual de fibrose.

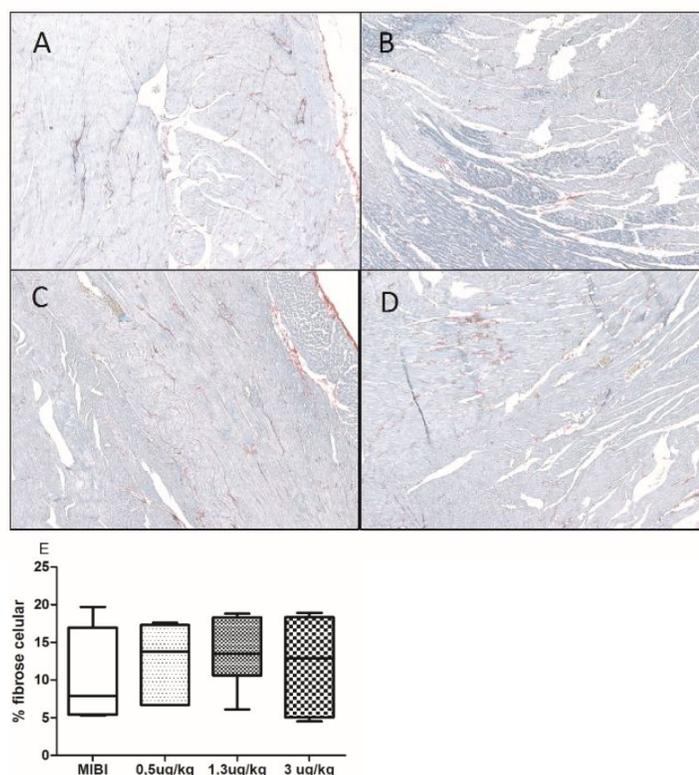


Figura 08: Fotomicrografias de tecido cardíaco de ratos submetidos ao protocolo de isquemia reperfusão e coletados após 24 horas da realização do modelo experimental. Os cortes histológicos foram corados com o corantevermelho de Picro-Sirius. Caracterização histoquímica de colágeno, sugerindo fibrose nas áreas coradas em vermelho, indicando fibras de colágeno distribuídas no tecido. Na imagem, A – Veículo; B – Sestamibi 0,5 µg/kg; C – Sestamibi 1,3 µg/kg; D – Sestamibi 3,0µg/kg. (E) Quantificação histoquímica de colágeno, representado como percentual de fibrose por valoresrelativosda área total da imagem.

Acredita-se que no coração infartado há um aumento significativo da degradação do colágeno pela ação das metaloproteinases (Thomas et al., 1998). No presente estudo foi observado que não houve mudança no padrão de deposição de colágeno devido ao uso de NPAu associada ao sestamibi, ou seja, não foi registrado diminuição de área de fibrose devido ao IAM. Esse dado é relevante, pois demonstra que uso de NPAu impediu o aumento da fibrose na área de IAM limitando a progressão da lesão miocárdica nesse modelo.

Embora existam preocupações quanto à sua toxicidade, NPs de Cerium (Ce), Ítrio (Y) e platina têm sido sugeridas como antioxidantes pois apresentaram efeitos contra a progressão da disfunção cardíaca e remodelamento pela regulação do estresse oxidativo miocárdico e dos processos inflamatórios (Schubert, 2006; Niu

et al., 2007; Yamagishi, 2013). Outros estudos de cardioproteção utilizaram NPs para alcançar o tecido cardíaco juntamente com outros fármacos (Dvir et al., 2011; Margulis et al., 2015; Bae et al., 2016) devido a característica “*drug-delivered*” das NPs.

5 CONCLUSÃO

Tomados em conjunto, os resultados do presente estudo demonstram que há uma importante interação química entre as moléculas de NPAu e o sestamibi e que as concentrações 0,3,0,7 e 1,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de NPAu (10nm) não promovem toxicidade em diferentes tecidos corporais e não agrava a lesão por reperfusão induzida por um modelo experimental de IAM, mostrando-se seguro sua aplicação experimental em ratos.

REFERÊNCIAS

Anderson ME. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods Enzymol.* 1985; 113: 548-55.

Antman EM, Tanasijevic MJ, Thompson B, Schactman M, McCabe CH, Cannon CP, et al. Cardiac-specific troponin I levels to predict the risk of mortality in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med.* 1996; 335(18): 1342-9.

Aromal SA, Philip D. Green synthesis of gold nanoparticles using *Trigonella foenum-graecum* and its size-dependent catalytic activity. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2012; 97: 1-5.

Bae S, Park M, Kang C, Dilmen S, Kang TH, Kang DG, Ke Q, et al. Hydrogen Peroxide-Responsive Nanoparticle Reduces Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury. *J Am Heart Assoc.* 2016; 5(11): e003697.

Barathmanikanth S, Kalishwaralal K, Sriram M, Pandian SR, Youn HS, Eom S. Anti-oxidant effect of gold nanoparticles restrains hyperglycemic conditions in diabetic mice. *J Nanobiotechnology.* 2010; 8-16.

Baud V, Karin M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol.* 2001; 11(9): 372-7.

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

Bodi V, Sanchis J, Nunez J, Mainar L, Minana G, Benet I, et al. Uncontrolled immune response in acute myocardial infarction: unraveling the thread. *Am Heart J.* 2008; 156(6): 1065-73.

Bouras G, Giannopoulos G, Hatzis G, Alexopoulos D, Leventopoulos G, Devereux S. Inflammation and chronic heart failure: from biomarkers to novel anti-inflammatory therapeutic strategies. *Med Chem.* 2014; 10(7):682-99.

Braunwald E, Kloner RA. Myocardial reperfusion: a double-edged sword? *J Clin Invest.* 1985; 76: 1713-19.

Bush BM. Interpretation of laboratory results for small animal clinicians. Oxford: Blackwell Scientific, 1991.

Cardoso E, Rezin GT, Zanoni ET, de Souza Notoya F, Leffa DD, Damiani AP, et al. Acute and chronic administration of gold nanoparticles cause DNA damage in the cerebral cortex of adult rats. *Mutat Res.* 2014; 766-767: 25-30.

Carlsson S. A glance at the history of nuclear medicine. *Acta Oncol.* 1995; 34(8): 1095-102.

Chen H, Dorrigan A, Saad S, Hare DJ, Cortie MB, Valenzuela SM. In vivo study of spherical gold nanoparticles: inflammatory effects and distribution in mice. *PLoS One.* 2013; 8(2): e58208.

Cohn JN, Levine TB, Olivari MT, Garberg V, Lura D, Francis GS, et al. Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart failure. *N Engl J Med.* 1984; 311(13): 819-23.

Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *J Am Coll Cardiol.* 2000; 35(3): 569-82.

Daniel MC, Astruc D. Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chem Rev.* 2004; 104(1): 293-346.

Dhalla NS, Kaura D, Liu X, Beamish RE. Mechanisms of subcellular remodeling in postinfarct heart failure. In: Konstam M, editor. *Myocardial Ischemia: Mechanisms, Reperfusion, Protection.* Birkhauser Verlag Basel: Basel, Switzerland 1996; 463-77.

Durán N, Morais PC, Mattoso LHC. Nanotecnologia: introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação. 1ª ed. São Paulo. Artliber. 2006.

Dvir T, Bauer M, Schroeder A, Tsui JH, Anderson DG, Langer R, et al. Nanoparticles for targeting the infarcted heart. *Nano Lett.* 2011; 11(10): 4411–14.

Ferrari R, Agnoletti L, Comini L, Gaia G, Bachetti T, Cargnoni A, et al. Oxidative stress during myocardial ischaemia and heart failure. *Eur Heart J.* 1998; 19 Suppl B: B2-11.

Francis GS, McDonald KM. Left ventricular hypertrophy: an initial response to myocardial injury. *Am J Cardiol.* 1992; 69(18):3G-7G; discussion 7G-9G.

Frangogiannis NG, Smith CW, Entman ML. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 2002; 53(1): 31-47.

Gao W, Bentley RC, Madden JF, Clavien PA. Apoptosis of sinusoidal endothelial cells is a critical mechanism of preservation injury in rat liver transplantation. *Hepatology.* 1998; 27(6): 1652-60.

Gaudron P, Eilles C, Kugler I, Ertl G. Progressive left ventricular dysfunction and remodeling after myocardial infarction. Potential mechanisms and early predictors. *Circulation.* 1993; 87(3): 755-63.

Gella J. Enzimologia clínica. In: Sastre FG. (Ed.) *Bioquímica clínica.* Barcelona: Barcanova, 1994. p.113-124.

Gurevitch J, Frolkis I, Yuhas Y, Paz Y, Matsa M, Mohr R, et al. Tumor necrosis factor-alpha is released from the isolated heart undergoing ischemia and reperfusion. *J Am Coll Cardiol.* 1996; 28(1): 247-52.

Hashmi S, Al-Salam S. Acute myocardial infarction and myocardial ischemia-reperfusion injury: a comparison. *J Clin Exp Pathol.* 2015; 8(8): 8786-96.

Ho KK, Pinsky JL, Kannel WB, Levy D. The epidemiology of heart failure: the Framingham Study. *J Am Coll Cardiol.* 1993; 22 (Suppl A): 6A-13A.

Huynh T, Perron S, O'Loughlin J, Joseph L, Labrecque M, Tu JV, Thérioux P. Comparison of primary percutaneous coronary intervention and fibrinolytic therapy in ST-segment-elevation myocardial infarction: bayesian hierarchical meta-analyses of randomized controlled trials and observational studies. *Circulation.* 2009; 119(24):3101-09.

Khan MS, Vishakante GD, Siddaramaiah H. Gold nanoparticles: a paradigm shift in biomedical applications. *Adv Colloid Interface Sci.* 2013; 199-200: 44-58.

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

Keeley EC, Boura JA, Grines CL. Primary angioplasty versus intravenous thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: a quantitative review of 23 randomised trials. *Lancet.* 2003; 361(9351):13-20.

Kloner RA, Przyklenk K. Understanding the jargon: a glossary of terms used (and misused) in the study of ischaemia and reperfusion. *Cardiovasc Res.* 1993; 27(2): 162-6; discussion 167-71.

Lipka J, Semmler-Behnke M, Sperling RA, Wenk A, Takenaka S, Schleh C, et al. Biodistribution of PEG-modified gold nanoparticles following intratracheal instillation and intravenous injection. *Biomaterials.* 2010; 31(25): 6574-81.

Margulis K, Neofytou EA, Beygui RE, Zare RN. Celecoxib Nanoparticles for Therapeutic Angiogenesis. *ACS Nano.* 2015; 9(9): 9416-26.

Mehta P, Cowie E. Epidemiology and pathophysiology of heart failure. *Medicine.* 2006; 34: 210-14.

Monsel A, Zhu YG, Gennai S, Hao Q, Liu J, Lee JW. Cell-based therapy for acute organ injury: preclinical evidence and ongoing clinical trials using mesenchymal stem cells. *Anesthesiology*. 2014; 121(5): 1099-121.

Mueller C. Biomarkers and acute coronary syndromes: an update. *Eur Heart J*. 2014; 35(9): 552-6.

Muradian J, Marques, FLN. Síntese da 2-metoxi isobutil isonitrila (MIBI) para uso médico. *Radio/. Bras*. 1992; 25: 171-172.

Naghavi M, Wang H, Lozano R, Davis A, Liang X, Zhou M, et al. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*. 2015; 385(9963):117-71.

Navarro VJ, Senior JR. Drug-related hepatotoxicity. *N Engl J Med*. 2006 Feb 16;354(7):731-9.

Newby LK, Christenson RH, Ohman EM, Armstrong PW, Thompson TD, Lee KL, et al. Value of serial troponin T measures for early and late risk stratification in patients with acute coronary syndromes. The GUSTO-IIa Investigators. *Circulation*. 1998; 98(18): 1853-9.

Niu J, Azfer A, Rogers LM, Wang X, Kolattukudy PE. Cardioprotective effects of cerium oxide nanoparticles in a transgenic murine model of cardiomyopathy. *Cardiovasc Res*. 2007; 73(3): 549-59.

Olivetti G, Capasso JM, Sonnenblick EH, Anversa P. Side-to-side slippage of myocytes participates in ventricular wall remodeling acutely after myocardial infarction in rats. *Circ Res*. 1990; 67(1): 23-34.

Olivetti G, Abbi R, Quaini F, Kajstura J, Cheng W, Nitahara JA, Quaini E, Di Loreto C, Beltrami CA, Krajewski S, Reed JC, Anversa P. Apoptosis in the failing human heart. *N Engl J Med*. 1997; 336(16):1131-41.

Papadopoulos M, Paschali E, Chiotellis, E. Synthesis, kit formulation analysis and biological studies of ^{99m}Tc-MIBI for myocardial perfusion imaging". Demokritos National Centre for Scientific Research, Athens, Greece, 1994.

Paula MM, Petronilho F, Vuolo F, Ferreira GK, De Costa L, Santos GP, et al. Gold nanoparticles and/or N-acetylcysteine mediate carrageenan-induced inflammation and oxidative stress in a concentration-dependent manner. *J Biomed Mater Res A*. 2015; 103(10): 3323-30.

Pesaro AE, Serrano Jr CV, Nicolau JC. Infarto agudo do miocárdio – síndrome coronariana aguda com supradesnível do segmento ST. *Rev Assoc Med Bras*. 2005; 50(2):214-20.

Piegas LS, Timerman A, Feitosa GS, Nicolau JC, Mattos LAP, Andrade MD, et al. V Diretriz da Sociedade Brasileira de Cardiologia sobre Tratamento do Infarto Agudo do Miocárdio com Supradesnível do Segmento ST. *Arq bras cardiol*. 2015; 105: 1-121.

Piper HM, García-Dorado D, Ovize M. A fresh look at reperfusion injury. *Cardiovasc Res*. 1998; 38(2): 291-300.

Rawles JM. Quantification of the benefit of earlier thrombolytic therapy: five-year results of the Grampian Region Early Anistreplase Trial (GREAT). *J Am Coll Cardiol*. 1997; 30(5):1181-86.

Rumberger JA, Behrenbeck T, Breen JR, Reed JE, Gersh BJ. Nonparallel changes in global left ventricular chamber volume and muscle mass during the first year after transmural myocardial infarction in humans. *J Am Coll Cardiol*. 1993; 21(3): 673-82.

Saleh HM, Soliman OA, Elshazly MO, Raafat A, Gohar AK, Salaheldin TA. Acute hematologic, hepatologic, and nephrologic changes after intraperitoneal injections of 18 nm gold nanoparticles in hamsters. *Int J Nanomedicine*. 2016; 11: 2505-13.

Schubert D, Dargusch R, Raitano J, Chan SW. Cerium and yttrium oxide nanoparticles are neuroprotective. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006; 342(1): 86-91.

Sun Y, Gates B, Mayers B, Xia Y. Crystalline Silver Nanowires by Soft Solution Processing. *Nano Letters*. 2002; 2 (2): 165–8.

Sun X, Wang W, Dai J, Jin S, Huang J, Guo C. A Long-Term and Slow-Releasing Hydrogen Sulfide Donor Protects against Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury. *Sci Rep*. 20177(1): 3541.

Thomas CV, Coker ML, Zellner JL, Handy JR, Crumbley AJ 3rd, Spinale FG. Increased matrix metalloproteinase activity and selective upregulation in LV myocardium from patients with end-stage dilated cardiomyopathy. *Circulation*. 1998; 97(17): 1708-15.

Thygesen K, Mair J, Katus H, Plebani M, Venge P, Collinson P, et al. Recommendations for the use of cardiac troponin measurement in acute cardiac care. *Eur Heart J*. 2010; 31(18): 2197-204.

Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Simoons ML, Chaitman BR, White HD, et al. Third universal definition of myocardial infarction. *Circulation*. 2012; 126(16): 2020-35.

Toderas F, Losin M, Astilean S. Luminescence properties of gold nanorods. *Nucl Instrum Methods Phys Res B*. 2009; 267: 400-2.

Turkevich J, Stevenson PC, Hillier J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discuss. Faraday Soc*. 1951; 11: 55-75.

Volders PG, Willems IE, Cleutjens JP, Arends JW, Havenith MG, Daemen MJ. Interstitial collagen is increased in the non-infarcted human myocardium after myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*. 1993; 25(11): 1317-23.

Wackers FJ, Berman DS, Maddahi J, Watson DD, Beller GA, Strauss HW, et al. Technetium-99m hexakis 2-methoxyisobutyl isonitrile: human biodistribution, dosimetry, safety, and preliminary comparison to thallium-201 for myocardial perfusion imaging. *J Nucl Med.* 1989; 30(3): 301-11.

Weisman HF, Bush DE, Mannisi JA, Bulkley BH. Global cardiac remodeling after acute myocardial infarction: a study in the rat model. *J Am Coll Cardiol.* 1985; 5(6): 1355-62.

Wong IY, Bhatia SN, Toner M. Nanotechnology: emerging tools for biology and medicine. *Genes Dev.* 2013; 27(22): 2397–2408.

World Health Organization (Who). Cardiovascular Diseases (CVDs). Disponível em: http://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/ (2017).

Xu Z, Alloush J, Beck E, Weisleder N. A murine model of myocardial ischemia-reperfusion injury through ligation of the left anterior descending artery. *J Vis Exp.* 2014; (86).

Yamagishi Y, Watari A, Hayata Y, Li X, Kondoh M, Yoshioka Y, et al. Acute and chronic nephrotoxicity of platinum nanoparticles in mice. *Nanoscale Res Lett.* 2013; 8(1): 395.

Yan X, Shichita T, Katsumata Y, Matsuhashi T, Ito H, Ito K, et al. Deleterious Effect of the IL-23/IL-17A Axis and $\gamma\delta$ T Cells on Left Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction. *J Am Heart Assoc.* 2012; 1(5): e004408.

Yang L, Kuang H, Zhang W, Aguilar ZP, Wei H, Xu H. Comparisons of the biodistribution and toxicological examinations after repeated intravenous administration of silver and gold nanoparticles in mice. *ScientificReports.* 2017; 7:3303.

Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med.* 2007; 357(11):1121-35.

Yusuf S, Reddy S, Ounpuu S, Anand S. Global and regional burden of cardiovascular disease and risk factors . *Circulation*. 2001; 104: 2746-53.

Zortéa D, Silveira PC, Souza PS, Fidelis GS, Paganini CS, Pozzi BG, et al. Effects of phonophoresis and gold nanoparticles in experimental model of muscle overuse: role of oxidative stress. *Ultrasound Med Biol*. 2015; 41(1): 151-62.