

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

LEANDRO DE COSTA DA SILVA

**EFEITO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO ASSOCIADAS À N-
ACETILCISTEÍNA SOBRE LESÃO PULMONAR AGUDA
INDUZIDA POR CARRAGENINA EM RATOS**

**CRICIÚMA
2013**

LEANDRO DE COSTA DA SILVA

**EFEITO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO ASSOCIADAS À N-
ACETILCISTEÍNA SOBRE LESÃO PULMONAR AGUDA
INDUZIDA POR CARRAGENINA EM RATOS**

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

Orientador: Prof. Dr. Marcos
Marques da Silva Paula

**CRICIÚMA
2013**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

S586e Silva, Leandro de Costa da.

Efeito de nanopartículas de ouro associadas à N-acetilcisteína sobre lesão pulmonar aguda induzida por carragenina em ratos / Leandro de Costa da Silva ; orientador : Marcos Marques da Silva Paula. – Criciúma : Ed. do Autor, 2013.

62 f. : il. ; 21 cm.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2013.

1. Nanopartículas de ouro. 2. Medicamentos - Administração. 3. Inflamação. 4. Pleurite. I. Título.

CDD 22. ed. 616.25

FOLHA INFORMATIVA

A dissertação foi elaborada seguindo o estilo ABNT e será apresentada no formato tradicional.

Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Síntese de Complexos Multifuncionais do Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, tendo a colaboração do Laboratório de Fisiopatologia Experimental e Laboratório de Fisiologia e Bioquímica do Exercício.



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)

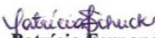
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria N° 1.919 de 03.06.2005

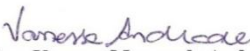
PARECER

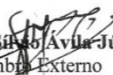
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Dissertação de MESTRADO apresentada pelo candidato **Leandro de Costa da Silva** sob o título “**Efeito de nanopartículas de ouro associados a n-acetilcisteína em lesão pulmonar aguda induzida por carragenina em ratos**” para obtenção do grau de **MESTRE 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 o candidato, os membros são de parecer pela “**APROVAÇÃO**” da Dissertação, com conceito C.

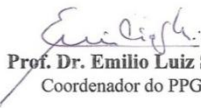
Criciúma, SC, 6 de março de 2013


Profa. Dra. Patricia Fernanda Schuck
Membro Relator


Profa. Dra. Vanessa Moraes de Andrade
Membro Unesc


Prof. Dr. Silvio Avila Júnior
Membro Externo


Prof. Dr. Marcos Marques da Silva Paula
Orientador


Prof. Dr. Emilio Luiz Streck
Coordenador do PPGCS

Dedico este trabalho a minha mãe Marli de Costa, por sempre estar ao meu lado nos momentos bons e ruins me incentivando e me apoiando, fazendo que eu superasse os desafios.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a DEUS por me dar saúde, sabedoria e forças para concluir esta caminhada.

Ao meu colega de mestrado Ronaldo Perfolli.

Ao professor Dr^o Marcos Marques da Silva Paula e a sua equipe de pesquisa.

E a todos que de forma direta e indireta me ajudaram durante essa caminhada.

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.” Albert Einstein.

RESUMO

Relatamos os efeitos de nanopartículas de ouro, em um modelo de inflamação aguda induzido por carragenina (CG), comparando o seu efeito com o antioxidante N-acetilcisteína (NAC) e o efeito sinérgico da associação de NAC e nanopartículas de ouro (GNP). Ratos Wistar machos receberam solução salina contendo 2% de CG na cavidade pleural, alguns receberam também NAC por via subcutânea e/ou GNP 10 mg/Kg, 25 mg/Kg e 50 mg/Kg na cavidade pleural, imediatamente após a lesão. Quatro horas mais tarde, os ratos foram mortos e o exsudato pleural foi obtido para avaliação dos níveis de citocinas e atividade da mieloperoxidase (MPO), e o estresse oxidativo foi avaliado no pulmão. As nanopartículas de ouro exibiram uma nítida ação anti-inflamatória e atividade antioxidante em diferentes doses, e muitas vezes mais eficaz do que o tratamento com NAC apenas. Os resultados do presente estudo sugerem que GNP desempenha um papel na inflamação aguda, que pode estar relacionado com a redução dos danos oxidativos, e que pode ser eficaz em aplicações terapêuticas.

Palavras chave: Nanopartículas de ouro. Inflamação. Estress oxidativo. Pleurite. N-acetilcisteína.

ABSTRACT

We report the effects of the gold nanoparticles (GNPs) in an acute inflammation model induced by carrageenan (CG) comparing its effect with the antioxidant N-acetylcysteine (NAC) and the synergistic effect of NAC and GNP association. Male Wistar rats received saline or saline containing 2% γ -CG into the pleural cavity, with some also receiving NAC 20mg/Kg subcutaneously and/or GNP 10 mg/kg, 25mg/kg e 50mg/kg, into the pleural cavity immediately after surgery. Four hours later, the rats were killed and pleural exudate was obtained for evaluation cytokines levels and myeloperoxidase (MPO) activity, and oxidative stress were evaluated in the lung. Gold nanoparticles exhibited pronounced anti-inflammatory actions and antioxidant activity at different doses, is often more effective than treatment with NAC only. The present findings suggest that GNP plays a role in acute inflammation that can be related with the reduction of oxidative damage and that it could be effective in therapeutic applications.

Keywords: Gold nanoparticles. Inflammation. Oxidative stress. Pleurisy. N-acetylcysteine.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Ilustração 1 – Níveis de citocina pró-inflamatória IL-1 β	35
Ilustração 2 - Níveis de citocina pró-inflamatória TNF- α	36
Ilustração 3 - Níveis da citocina IL-10	37
Ilustração 4 - Atividade da Mieloperoxidase.....	38
Ilustração 5 - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.....	39
Ilustração 6 - Conteúdo de grupamentos carbonila	39
Ilustração 7 - Grupos sulfidrilas	40
Ilustração 8 - Atividade da enzima antioxidante Superóxido Dismutase	41
Ilustração 9 - Atividade da enzima antioxidante Catalase.....	42
Ilustração 10 - Atividade da enzima antioxidante Glutaciona Peroxidase	43
Ilustração 11 - Representação esquemática da interação GNP e NAC .	46

LISTA DE ABREVIATURAS

- APC – Célula Apresentadora de Antígenos, do inglês, *Antigen-Presenting Cell*
- CAT – Catalase
- CG – Carragenina
- DNPH – Dinitrofenilhidrazina do inglês, *Dinitrophenyehidrazine*
- eNOS – Óxido Nítrico Sintase Endotelial
- EPM – Erro Padrão Médio
- ERO – Espécies Reativas de Oxigênio
- GNP – Nanopartículas de Ouro do inglês, *Gold Nanoparticles*
- GPX – Glutationa Peroxidase
- GR – Glutationa Redutase
- GSH – Glutationa
- GSSG – Glutationa Oxidada
- IL 1 β – Interleucina 1 β
- IL 8 – Interleucina 8
- iNOS – Óxido Nítrico Sintase Induzível
- MHC – Complexo de Histocompatibilidade Principal do inglês, *Major Histocompatibility Complex*
- MPO – Mieloperoxidase
- NAC – N-acetilcisteína
- NADPH – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Reduzido
- nNos – Óxido Nítrico Sintase Neuronal
- NO – Óxido Nítrico do inglês, *Nitric Oxide*
- NOS – Óxido Nítrico Sintase do inglês, *Nitric Oxide Synthase*
- PMN – Polimorfonucleares
- SOD – Superóxido Dismutase
- SPSS – Pacote Estatístico Para as Ciências Sociais, do inglês *Statistical Package for the Social Sciences*
- TBA-RS – Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico, do inglês *Thiobarbituric Acid Reactive Substances*
- TNF- α – Fator de Necrose Tumoral- α do inglês, *Tumor necrosis factor α*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 FISILOGIA DA INFLAMAÇÃO	21
1.2 RESPOSTA INFLAMATÓRIA.....	21
1.2.1 MIGRAÇÃO DE LEUCÓCITOS	21
1.2.2 FAGOCITOSE.....	22
1.3 ESTRESSE OXIDATIVO.....	23
1.3.1 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO	23
1.3.2 ESPÉCIES REATIVAS DE NITROGÊNIO.....	24
1.4 DEFESAS ANTIOXIDANTES	25
1.5 MATERIAIS NANOPARTICULADOS	25
1.6 CARRAGENINA.....	27
1.7 N-ACETILCISTEÍNA.....	27
2 OBJETIVOS.....	29
2.1 OBJETIVO GERAL	29
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
3 MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1 PREPARAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO.....	31
3.2 ANIMAIS	31
3.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	31
3.4 INDUÇÃO DE PLEURITE.....	32
3.5 PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS	32

3.5.1 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE CITOCINA	32
3.5.2 ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE NO TECIDO PULMONAR	32
3.6 PARÂMETROS OXIDATIVOS	33
3.6.1 SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBA-RS) NO TECIDO PULMONAR	33
3.6.2 DETERMINAÇÃO DO GRUPAMENTO CARBONILA NO TECIDO PULMONAR DE RATOS	33
3.6.3 DETERMINAÇÃO DOS GRUPOS SULFIDRILAS NO TECIDO PULMONAR DE RATOS	33
3.7 DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES NO TECIDO PULMONAR DE RATOS	34
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	34
4 RESULTADOS.....	35
4.1 PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS	35
4.2 PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO	38
5 DISCUSSÃO	45
6 CONCLUSÃO	51
REFERÊNCIAS.....	53

1 INTRODUÇÃO

1.1 FISIOLOGIA DA INFLAMAÇÃO

Inflamação é um termo geral para as mudanças que podem ocorrer nos tecidos vascularizados como resposta a danos teciduais, infecções ou reações imunológicas (Gilman et al., 2006; Spinosa et al., 2006). A resposta inflamatória é essencial para a sobrevivência, tentando proteger o organismo de estímulos nocivos. Em algumas situações e doenças, essa resposta pode se tornar excessiva, sem qualquer benefício e com sérios efeitos adversos (Cotran et al., 2000). As funções da inflamação incluem a destruição ou inativação do agente ou irritante inicial e então a limpeza dos debris celulares na área para que a reparo tecidual possa ocorrer (Roth et al., 2009).

Diante de um trauma tissular, as células liberam uma citocina denominada fator de necrose tumoral (TNF- α) que por sua vez, induz a liberação de outras citocinas, podendo se destacar a interleucina 1-Beta (IL-1 β) e a interleucina 8 (IL-8) (Gilman et al., 2006). A liberação dos mediadores leva ao intumescimento tecidual, devido ao extravasamento de proteínas plasmáticas, e consequente saída de água para o tecido e a penetração de células inflamatórias, tendo como principal objetivo debelar o agente agressor (Gilman et al., 2006; Spinosa et al., 2006).

1.2 RESPOSTA INFLAMATÓRIA

1.2.1 MIGRAÇÃO DE LEUCÓCITOS

Em resposta a um dano tissular, uma rede multifatorial de sinais químicos inicia e mantém uma resposta do hospedeiro designada a reparar o tecido afetado. (Proost et al., 1996). Por recrutar células efetoras específicas, as quimiocinas podem controlar a evolução natural da resposta inflamatória (Wahl e Kleinman, 1998).

Os neutrófilos são as primeiras células recrutadas para o sítio inflamatório e também os principais efetores da lesão tecidual, através da produção de proteases e radicais derivados do metabolismo do oxigênio e nitrogênio (Keel et al., 1997). Os neutrófilos possuem no seu citoplasma os grânulos azurófilos que contém várias proteínas catiônicas microbicidas como a mieloperoxidase, cathepsina G, elastase, dentre outros (Filho, 2000). A migração dos neutrófilos é seguida pelos monócitos, que se diferenciam em macrófagos, desempenhando uma grande variedade de funções, tais como: apresentação de antígenos,

regulação da inflamação (AL-Sarireh e Eremin, 2000). Uma vez ativados, os macrófagos são a principal fonte de mediadores como citocinas, fatores de crescimento e óxido nítrico (NO), capazes de alterar as células endoteliais, epiteliais e mesenquimais no tecido lesado, ou no microambiente tumoral (Coussens e Werb, 2002).

1.2.2 FAGOCITOSE

A fagocitose envolve o reconhecimento de antígenos por receptores de superfície nas células fagocíticas, iniciando a polimerização e internalização de partículas externas ou organismos no fagossomo (Allen e Aderem, 1996). Na superfície do fagócito são expressos vários receptores capazes de reconhecer e decodificar seus ligantes cognatos presentes na superfície de agentes infecciosos e células apoptóticas e desencadear o englobamento (Stuart e Ezekowitz, 2005). Em organismos superiores, os receptores específicos em mediar a fagocitose são expressos quase exclusivamente em macrófagos, neutrófilos e monócitos (Kwiatkowska e Sobota, 1999). A fagocitose é seguida pela fusão do fagossomo com lisossomos contendo enzimas digestivas, formando o fagolisossomo, e a degradação da partícula para a apresentação do antígeno, ativação do citoesqueleto e reciclagem de nutrientes (Stuart e Ezekowitz, 2005).

Os macrófagos são as principais células fagocitárias e podem internalizar partículas com maior rapidez e eficiência que outras células (Albert et al., 1998). O macrófago realiza a degradação intracelular e a apresentação de fragmentos de peptídeos na sua superfície celular, associado ao complexo de histocompatibilidade principal (MHC) classe I ou II, atuando como apresentador de antígenos (APC) (Filho, 2000). Células dendríticas também são potentes células fagocitárias e são consideradas as principais APCs (Albert et al., 1998).

A autorregulação da fagocitose protege o organismo de inflamações incontroláveis e pode ser realizada por citocinas pró-inflamatórias (Ren e Savill, 1995), fatores solúveis como o monofostato de adenosina cíclico (Rossi et al., 1998), glicocorticoides (Liu et al., 1999; Giles et al., 2001), proteínas da matriz extracelular como a fibronectina (Mccutcheon, 1998) e colágeno (Newman e Tucci, 1990), ou moléculas de superfície celular como CD44 (Mccutcheon et al., 1998).

A fagocitose também realiza o remodelamento e a homeostase do número de células. Neste caso, a apoptose é um processo essencial pelo qual o excesso de células ou células danificadas são removidas durante o

desenvolvimento (Stuart e Ezekowitz, 2005). Diferente de patógenos, células apoptóticas são ativamente anti-inflamatórias, e nesse caso a produção de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos é limitada (Voll et al., 1997; Fadok et al., 1998), o que protege o organismo da auto-reatividade induzida por células mortas.

1.3 ESTRESSE OXIDATIVO

O estresse oxidativo está associado a processos fisiológicos, como o envelhecimento, e doenças crônicas, tais como aterosclerose, diabetes e câncer. (Pawlak et al., 1998) Pode ser definido como resultado do desequilíbrio entre a produção de espécies oxidantes e a defesa do sistema antioxidante do organismo (Goetz & Luch, 2008; Stephens et al., 2009).

As espécies reativas de oxigênio (ERO), que podem ser radicais livres ou não (como os peróxidos), estão em um estado mais reativo que o oxigênio molecular (Pawlak et al., 1998). Dentre as espécies radicalares mais importantes no contexto biológico estão os íons superóxido, hidroxila e o NO. As espécies não-radicalares principais são peróxido de hidrogênio, ácido hipocloroso e oxigênio *singlet* (Monaghan et al., 2009). Um desequilíbrio redox pode resultar na morte celular, após oxidação generalizada de macromoléculas (lipídeos, proteínas), também causando efeitos adversos (Stephens et al., 2009). O termo antioxidante é amplamente definido como qualquer substância que retarda ou evita a oxidação de um substrato. Quando este é suficiente em balancear o ataque das ERO, o organismo reduz o estresse oxidativo (Powers e Jackson, 2008; Monaghan et al, 2009).

1.3.1 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

O ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) constitui a ERO primária, pois é formado em sistemas biológicos pela primeira redução do oxigênio molecular (Genestra, 2007). Essa reação ocorre geralmente nas membranas mitocondriais onde 95 a 98% do oxigênio molecular é reduzido por quatro elétrons. Porém de 2 a 5% podem não receber todos os elétrons, produzindo as ERO (Pawlak et al., 1998). Uma vez gerado, o ânion superóxido pode agir com um radical livre fraco, como elétron redutor ou elétron oxidante. (Goetz e Luch, 2008; Powers e Jackson, 2008). O ânion superóxido é formado principalmente como um intermediário nas reações bioquímicas, durante o processo de transferência de elétrons (Pawlak et al., 1998).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é um composto reativo que pode facilmente gerar radicais livres como o radical hidroxil ($OH\cdot$) em circunstâncias específicas (Goetz e Luch, 2008). O peróxido de hidrogênio é estável, permeável às membranas, e tem uma meia-vida relativamente longa no interior da célula. É citotóxico, mas é considerado um agente oxidante relativamente fraco (Powers e Jackson, 2008). Por sua vez, os radicais hidroxil ($OH\cdot$) são altamente reativos com forte poder oxidante e resultam da transferência de elétrons entre peróxido de hidrogênio e metais de transição (Goetz e Luch, 2008). São as ERO mais prejudiciais, visto que interagem com biomoléculas imediatamente após sua geração. Pressupõe-se que o radical $OH\cdot$ contribua para vários processos fisiopatológicos, como envelhecimento (Powers e Jackson, 2008).

O oxigênio *singlet* é outra forma reativa de oxigênio que pode ser gerado em alguns materiais biológicos. Tem meia vida muito curta e é produzido durante a contração esquelética muscular no exercício (Powers e Jackson, 2008).

1.3.2 ESPÉCIES REATIVAS DE NITROGÊNIO

O NO é sintetizado a partir da arginina pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), a qual ocorre em três tipos principais: NOS endotelial (eNOS), NOS neuronal (nNOS) e NOS induzida (iNOS) (Goetz e Luch, 2008). Em condições fisiológicas, o NO é um potente vasodilatador. Em situações de desequilíbrio do seu metabolismo, o NO (agente redutor fraco) reage com o oxigênio ou com o superóxido, produzindo peroxinitrito (Powers e Jackson, 2008). Assim, NO pode ter efeitos benéficos, mas quando produzido em grandes quantidades pela iNOS é pró-inflamatório na aterosclerose, contribuindo para o desenvolvimento da lesão (Zhang et al., 1992).

O peroxinitrito ($ONOO\cdot$) ou sua forma protonada ($ONOOH$) é formado a partir da reação do superóxido com o NO. É um forte oxidante e pode levar ao esgotamento de grupos tiol, causando danos ao DNA e nitração de proteínas (Goetz e Luch, 2008; Powers e Jackson, 2008). O hipoclorito ($HOCl$) é predominantemente formado por neutrófilos e pode, na sua forma ácida (ácido hipocloroso), atravessar membranas celulares e causar fragmentação e agregação de proteínas (Powers e Jackson, 2008).

1.4 DEFESAS ANTIOXIDANTES

1.4.1 ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS

Para a eliminação das espécies reativas de oxigênio um sistema de elevada sincronia trabalha de forma altamente cooperativa. (Sies, 1993). Os antioxidantes enzimáticos são representados pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPX) e glutathiona redutase (GR) (Bonney et al., 2002).

A SOD é uma metaloenzima que é encontrada abundantemente em células aeróbias. Cabe a SOD a dismutação do radical superóxido a peróxido de hidrogênio, que por sua vez é menos reativo e pode ser facilmente degradado por outras enzimas (Fridovich, 1998). A GPX é uma enzima que utiliza varias formas de redutores celulares para inativar os peróxidos, além de agirem sobre o H_2O_2 , também neutralizam peróxidos orgânicos, como alquil-hidroperóxidos (Bonney et al., 2002). A CAT é uma ferrihemoenzima que tem por função principal dismutar o peróxido de hidrogênio, formando água e oxigênio molecular (Fridovich, 1998).

1.4.2 ANTIOXIDANTES NÃO ENZIMÁTICOS

O sistema de antioxidantes não enzimáticos ajudam na eliminação de radicais livres através da doação de elétrons ou hidrogênio. Os antioxidantes não enzimáticos são encontrados nos alimentos como as vitaminas (C e E), minerais (zinco, selênio), provitaminas (alguns carotenóides), aminoácidos (taurina), flavonóides e polifenóis (Biesalsk, 2000).

1.5 MATERIAIS NANOPARTICULADOS

As nanopartículas são partículas coloidais que apresentam o tamanho de 1 a 100 nanômetros em pelo menos uma de suas dimensões, e podem ser utilizadas como agentes de liberação de princípios ativos (Ghosh et al., 2008). O tamanho reduzido das partículas do princípio ativo aumenta a velocidade de dissolução e a sua solubilidade, levando assim a um melhor desempenho do fármaco *in vivo*. (Kharb, 2006)

Os benefícios potenciais dos nanomateriais para a saúde humana são aceitos na literatura. Devido à sua inércia química, o ouro tem sido usado internamente em humanos nos últimos 50 anos em implantes dentários (Daniel e Astruc, 2004; Soto et al., 2006; Zhou et al., 2009). A

nanopartícula é uma tecnologia relativamente nova no meio da ciência, e tem uma infinidade de aplicações em potencial como sistemas nanométricos para liberação de fármacos encapsulados em alvos pré-determinados (Greb, 2008). Partículas nanométricas apresentam uma grande área superficial, além de exibirem propriedades ópticas, magnéticas, mecânicas ou químicas que diferem das superfícies e partículas em escala macroscópicas (Quina, 2004).

A síntese e o controle dos materiais em nanoescala podem antecipar a fabricação e o controle da estrutura da matéria num nível molecular e representam o início de uma nova era revolucionária (Duran et al., 2006). Como em qualquer outra área da tecnologia que faz uso intensivo de novos materiais e substâncias químicas, a nanotecnologia também trás consigo riscos ao meio ambiente e à saúde humana em geral (Quina, 2004).

1.5.1 NANOPARTÍCULAS DE OURO

As nanopartículas de ouro (GNP) emergiram como sendo um meio excelente para transportar diversas proteínas, portanto, quanto mais eficaz for à distribuição destes agentes melhor será a sua ação terapêutica (Ghosh et al., 2008). Num estudo foi avaliado a entrega de GNP em artrite reumatóide através da via intra-articular, os resultados mostraram que GNPs inibiram a proliferação e migração celular, além dos níveis de TNF- α e infiltração de macrófagos (Tsai et al., 2007; Pedersen et al., 2009).

Estudos recentes sugerem que as GNP podem interagir com os grupos tióis, que estão presentes em proteínas das bactérias, ultrapassando a membrana celular da bactéria (Daniel e Astruc, 2004). Em consequência os íons monovalentes substituem o cátion hidrogênio (H^+) de grupos tióis, inativando a proteína e assim, diminuindo a permeabilidade da membrana, que pode causar eventualmente a morte bacteriana (Swan, 1999). Devido ao núcleo do ouro permanecer inerte e não tóxico, irá facilitar sua síntese, sendo assim eles podem ser facilmente modificados para dar várias funcionalidades e boa biocompatibilidade (Sonavane et al., 2008). Para a síntese de nanopartículas alguns critérios devem ser observados como: serem processos simples, contínuos e eficientes; ser viável para produção em larga escala; separar de forma eficiente partículas com diferentes tamanhos (Kharb, 2006).

Grace et al. (2007) associaram GNP com antibióticos aminoglicosídeos gerando um complexo ouro-antibiótico mais potente e

de maior espectro de ação em relação ao antibiótico não associado. Diebold et al. (2010) avaliaram GNP para entrega de fármacos nos olhos, os resultados sugerem que a medicina ocular vai se beneficiar dessa nova tecnologia.

1.6 CARRAGENINA

A carragenina (CG) é um polissacarídeo de elevado peso molecular que é utilizado para avaliar a contribuição dos mediadores envolvidos nas alterações vasculares associadas com a inflamação aguda como edema de pata e pleurite (Lentsch e Ward, 2001). Injeção de CG no espaço pleural leva a pleurite, caracterizado por um dos neutrófilos imediato a sair da circulação para o tecido inflamado e tem uma função chave na degradação e remodelação dos tecidos danificados (Nantel et al., 1999). Este evento local induzido por CG está relacionado com a produção de radicais livres derivados de neutrófilos, tais como peróxido de hidrogênio, radicais superóxido e hidroxila (Salvemini et al., 1996). Assim, o recrutamento dos neutrófilos resulta em danos do parênquima pulmonar e disfunções pulmonares subsequentes em levar à morte celular por dano oxidativo ao DNA, proteínas e peroxidação lipídica das membranas celulares (Ward, 2010).

1.7 N-ACETILCISTEÍNA

Clinicamente, a N-acetilcisteína (NAC) tem sido usada como um antídoto para o hepatotoxicidade, um agente quelante para envenenamento por metais pesados (Lee et al, 2013). A NAC é um precursor da glutatona (GSH) utilizado no tratamento da bronquite crônica e outras patologias pulmonares. Trata-se de um composto tiólico e é fonte potencial de equivalentes redutores (Atkuri et al., 2007). Além disso, a NAC tem sido amplamente investigada pela sua eficácia na terapia complementar contra o câncer. Por muitos anos vem sendo utilizado como um medicamento mucolítico no tratamento da bronquite crônica (Lee et al, 2013).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar o efeito de GNP associado a NAC em modelo animal de lesão pulmonar aguda.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o possível efeito sinérgico da associação de NAC e GNP em um modelo animal;
- Determinar os níveis de citocinas (TNF- α , IL-1 β e IL-10) no exsudato pulmonar de ratos;
- Avaliar as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) no tecido pulmonar de ratos;
- Avaliar a atividade da mieloperoxidase no tecido pulmonar de ratos;
- Avaliar o conteúdo de grupamentos carbonila no tecido pulmonar de ratos;
- Avaliar o conteúdo dos grupos sulfidrilas no tecido pulmonar;
- Avaliar no tecido pulmonar de ratos a atividade das enzimas CAT, SOD e GPX.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 PREPARAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO

A vidraria foi previamente limpa com água régia (HCl:HNO₃ 3:1). As GNP foram então preparadas pela redução química de ácido auroclorídrico com citrato de sódio, empregando o método usado por Turkevich (1951).

Resumidamente, 5 mL de citrato de sódio 39 mM foi dissolvido em 25 mL de água ultra pura e reservado. Ácido auroclorídrico 0,2 mM foi diluído em 50 mL do mesmo solvente e, após, foi aquecido e mantido a 90 °C quando uma alíquota da solução de citrato descrita foi adicionada. O processo permaneceu em refluxo por 20 minutos em uma temperatura de 20°C ±2°C, após o processo as nanopartículas foram centrifugadas a 13.000 rpm por 10 minutos e após o sobrenadante foi removido e o pó resultante foi resuspendido com a adição de solução salina e após armazenada a 7°C.

3.2 ANIMAIS

Foram utilizados 72 ratos Wistar machos (pesando 250-350g) obtidos a partir do biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense e foram utilizados para a indução da pleurite. Eles foram engaiolados em grupos de oito, com livre acesso à comida e água, e foram mantidos num ciclo de 12 h de luz-escuridão, a uma temperatura de 22°C ± 1°C. Todos os procedimentos experimentais envolvendo os animais foram realizados de acordo com o National Institutes of Care (Bethesda, MD, EUA), Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório, com a aprovação da comissão de ética no uso de animais da Universidade do Sul de Santa Catarina, com o protocolo n° 12.015.4.03.IV.

3.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram divididos em nove grupos (n=8 animais por grupo):

- Grupo 1 (salina + salina);
- Grupo 2 (CG 2% + salina);
- Grupo 3 (CG 2% + NAC);
- Grupo 4 (CG 2% + GNP 10 mg/Kg);
- Grupo 5 (CG 2% + GNP 25 mg/kg);

- Grupo 6 (CG 2% + GNP 50 mg/kg);
- Grupo 7 (CG 2% + GNP 10 mg/kg + NAC);
- Grupo 8 (CG 2% + GNP 25 mg/kg + NAC);
- Grupo 9 (CG 2% + GNP 50 mg/kg + NAC).

3.4 INDUÇÃO DE PLEURITE

A pleurite foi induzida por CG como descrito anteriormente (Vinegar et al., 1943). Os ratos foram anestesiados com cloridrato de cetamina e submetidos a uma incisão na pele ao nível do sexto espaço intercostal esquerdo, o músculo subjacente foi dissecado e solução salina contendo 2% de CG (0,2 ml) foi injetada na cavidade pleural de ratos nos grupos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9. O primeiro grupo de animais recebeu somente salina. Os grupos 3, 7, 8 e 9 receberam NAC 20 mg/Kg por via subcutânea. Os grupos 4 e 7 receberam 10 mg/kg de GNP na cavidade pleural. Os grupos 5 e 8 receberam 25 mg/kg de GNP na cavidade pleural. Os grupos 6 e 9 receberam 50 mg/kg de GNP na cavidade pleural. A incisão da pele foi fechada com uma sutura e quatro horas após a indução da pleurite os animais foram mortos (Pereira et al., 2006) e, aproximadamente, 1 mL de exsudato pleural de cada animal foram obtidos para determinação dos níveis de citocinas e o pulmão foi separado para avaliar a atividade de MPO e parâmetros de dano oxidativo.

3.5 PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS

3.5.1 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE CITOCINA

As concentrações de TNF- α , IL-1 β e IL-10 foram determinadas em exsudato pleural por um teste imunoenzimático (ELISA) utilizando *kits* comerciais (R&D Systems, Minneapolis, MN).

3.5.2 ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE NO TECIDO PULMONAR

Os tecidos foram homogeneizados (50mg/mL) em brometo de hexadeciltrimetilamônio a 0,5% e centrifugou-se a 15000 \times g durante 40 minutos. A suspensão foi então sonicada três vezes durante 30 segundos. Uma alíquota do sobrenadante foi misturada com uma solução de 1,6 mM de tetrametilbenzidina e 1 mM de H₂O₂. A atividade

foi medida espectrofotometricamente, como a variação de absorvância a 650 nm a 37°C (Young et al., 1989).

3.6 PARÂMETROS OXIDATIVOS

3.6.1 SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBA-RS) NO TECIDO PULMONAR

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

3.6.2 DETERMINAÇÃO DO GRUPAMENTO CARBONILA NO TECIDO PULMONAR DE RATOS

O dano oxidativo das proteínas foi avaliado por meio da determinação do teor de grupos carbonila, com base na reação com dinitrofenilhidrazina (DNPH) (Levine et al., 1990). Resumidamente, as proteínas foram precipitadas pela adição de 20% de ácido tricloroacético e redissolvido em DNPH, e a absorvância foi lida monitorada a 370 nm.

3.6.3 DETERMINAÇÃO DOS GRUPOS SULFIDRILAS NO TECIDO PULMONAR DE RATOS

O teor total de grupos tiois foi determinado utilizando o método 5,5-ditiobis (2-nitrobenzótico) (DTNB). As condições de medição do DTNB foi como descrito em (Riddles et al., 1983), com algumas modificações. Resumidamente, 30 µL de uma amostra foi misturada com 1 ml de PBS/1 mM EDTA (pH 7,5). A reação foi iniciada pela adição de 30 µL de uma solução 10 mM de DTNB em PBS. As amostras de controle, isto é, que não contendo DTNB ou proteína, foram medidas simultaneamente. Após 30 min de incubação à temperatura ambiente, a quantidade de TNB formada [equivalente ao valor de sulfidrilo (SH)] foram calculadas com base na absorvância a $\lambda_{\max} = 412$ nm.

3.7 DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES NO TECIDO PULMONAR DE RATOS

A atividade da CAT no tecido pulmonar foi medida pela taxa de diminuição da absorbância de peróxido de hidrogênio a 240 nm (Aebi, 1984).

Atividade SOD foi determinada por medição da inibição da auto-oxidação da adrenalina, como descrito anteriormente (Bannister e Calabrese, 1987).

A atividade da GPX foi determinada pelo método de Wendel (1981) que utiliza o peróxido de terbutila como substrato da reação, ocorrendo a oxidação da GSH pela GPX gerando GSSG, que é convertido em GSH pela glutathione redutase, consumindo nessa reação uma molécula de NADPH, a qual pode ser acompanhada em espectrofotômetro a 340nm. O meio de reação foi composto por tampão K_2HPO_4 50 mM pH 7,0, EDTA 1mM, glutathione redutase 0,1U/mL, GSH 1mM e NADPH 0,2mM. A reação foi iniciada com a adição de peróxido de terbutila 0,5mM e acompanhada durante 5 minutos. ($\epsilon_{NADPH}=6,22 \times 10^3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Todos os parâmetros bioquímicos para determinação do conteúdo de proteínas foram normalizados utilizando como padrão albumina bovina (Lowry et al., 1951).

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

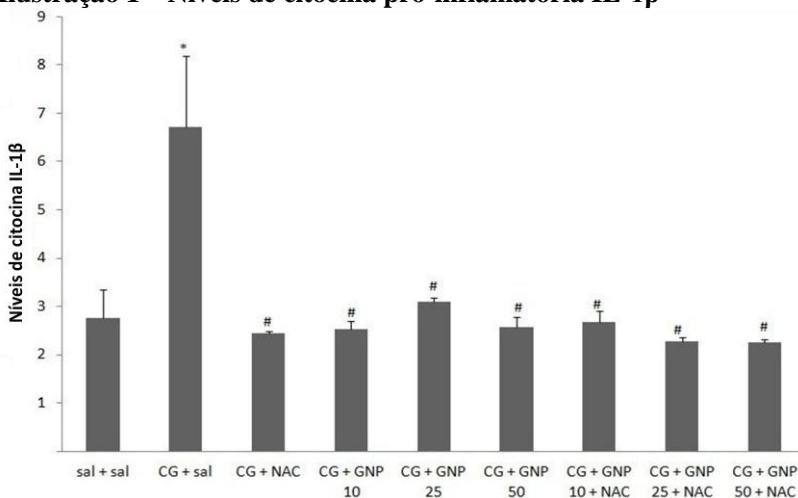
Os resultados são expressos como média \pm EPM e $p < 0,05$ foi considerado significativo. As diferenças entre os grupos foram determinadas por meio da análise de variância, seguida pelo teste de Tukey. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o SPSS 20,0 for Windows (SPSS, Chicago, IL, EUA).

4 RESULTADOS

4.1 PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS

Através da análise dos parâmetros de mediadores inflamatórios as ilustrações 1 e 2 mostram que houve um aumento de citocinas pró-inflamatórias, IL-1 β e TNF- α quando administrado CG (grupo 2) em relação ao grupo que recebeu apenas a solução salina (grupo 1). Para os níveis de IL-1 β (ilustração 1), observou-se a redução em todos os tratamentos. Entretanto para os níveis de TNF- α (ilustração 2), podemos observar que nos grupos 4, 5 e 6 que receberam somente GNP em doses diferentes houve uma diminuição expressiva desses níveis, enquanto que os grupos 7 e 9 que receberam GNP + NAC os índices parecem acompanhar o grupo 3 que recebeu somente NAC.

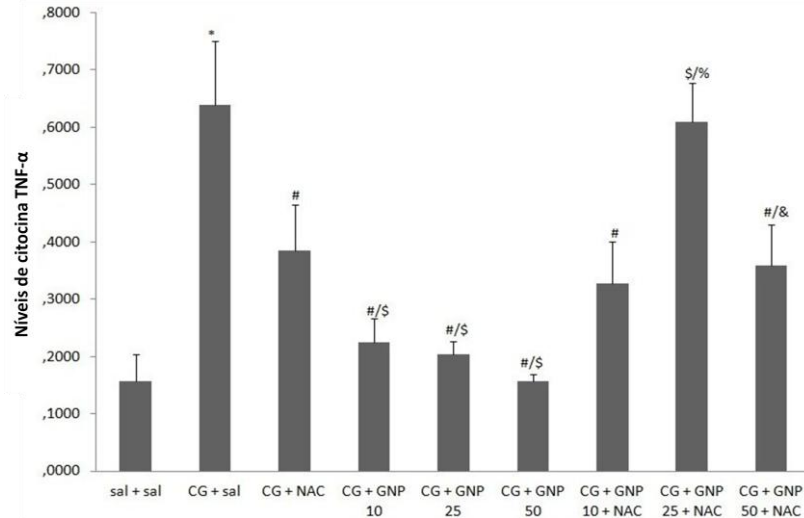
Ilustração 1 – Níveis de citocina pró-inflamatória IL-1 β



Fonte: do autor

Interleucina 1 β – Níveis no exsudato pleural de ratos submetidos a administração de carragenina e tratados com NAC 20 mg/Kg e/ou GNP 10, 25 e 50 mg/Kg. Os resultados são expressos com média \pm desvio padrão, n=8 animais por grupo; * p<0,05 comparado com o grupo sal +sal; # p<0,05 comparado com o grupo CG + sal.

Ilustração 2 - Níveis de citocina pró-inflamatória TNF- α

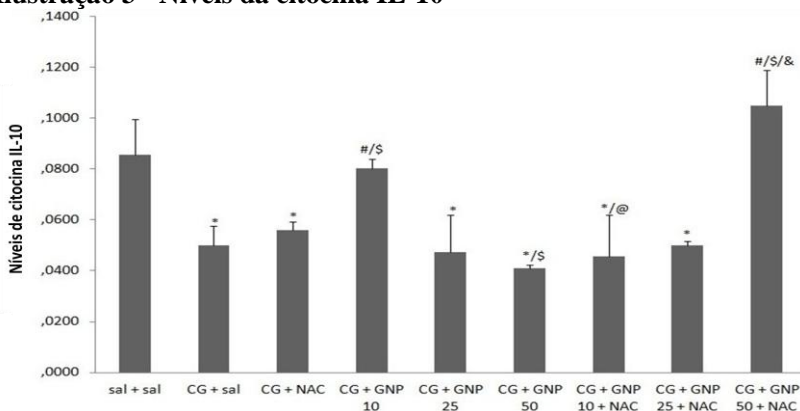


Fonte: do autor

TNF- α – Níveis no exsudato pleural de ratos submetidos a administração de carragenina e tratados com NAC 20 mg/Kg e/ou GNP 10, 25 e 50 mg/Kg. Os resultados são expressos com média \pm desvio padrão, n=8 animais por grupo; * p<0,05 comparado com o grupo sal + sal; # p<0,05 comparado com o grupo CG + sal; \$ p<0,05 comparado com o grupo CG + NAC; % p<0,05 comparado com o grupo CG + GNP 25 mg/Kg; & p<0,05 comparado com o grupo CG + GNP 50 mg/Kg.

Quando avaliados os níveis da citocina IL-10 (ilustração 3), que tem um perfil característico anti-inflamatório, verificou-se que o grupo que recebeu apenas a CG (grupo 2) o nível diminuiu em relação ao tratamento com solução salina (grupo 1) e a seguir, apenas GNP 10mg/kg (grupo 4) e NAC + GNP 50 mg/kg (grupo 9) parecem reverter estes níveis.

Ilustração 3 - Níveis da citocina IL-10

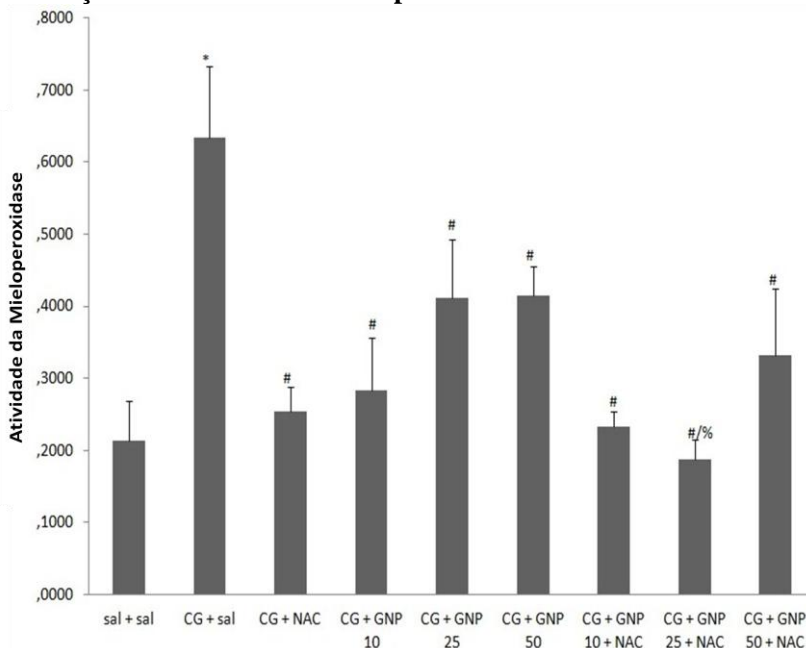


Fonte: do autor

Interleucina 10 – Níveis no exsudato pleural de ratos submetidos à administração de carragenina e tratados com NAC 20 mg/Kg e/ou GNP 10, 25 e 50 mg/Kg. Os resultados são expressos com média ± desvio padrão, n=8 animais por grupo; * p<0,05 comparado com o grupo sal + sal; # p<0,05 comparado com o grupo CG + sal; \$ p<0,05 comparado com o grupo CG + NAC; % p<0,05 comparado com grupo CG + GNP 25 mg/Kg; & p<0,05 comparado com o grupo CG + GNP 50 mg/Kg; @ p<0,05 comparado com o grupo CG + GNP 10 mg/Kg.

Após a avaliação dos mediadores inflamatórios, foi avaliada a atividade da enzima MPO, um indicativo de infiltração de neutrófilos no tecido pulmonar, e em paralelo a resposta de citocinas pró-inflamatórias, verificou-se que ocorre um aumento de MPO no grupo que recebeu apenas CG (grupo 2) com uma diminuição significativa em todos os tratamentos, embora a associação de NAC e GNP 25 mg/kg (grupo 8) foi mais eficaz do que a administração da NAC sozinha (grupo 3) ou a administração de GNP apenas (grupos 4, 5 e 6) (ilustração 4).

Ilustração 4 - Atividade da Mieloperoxidase



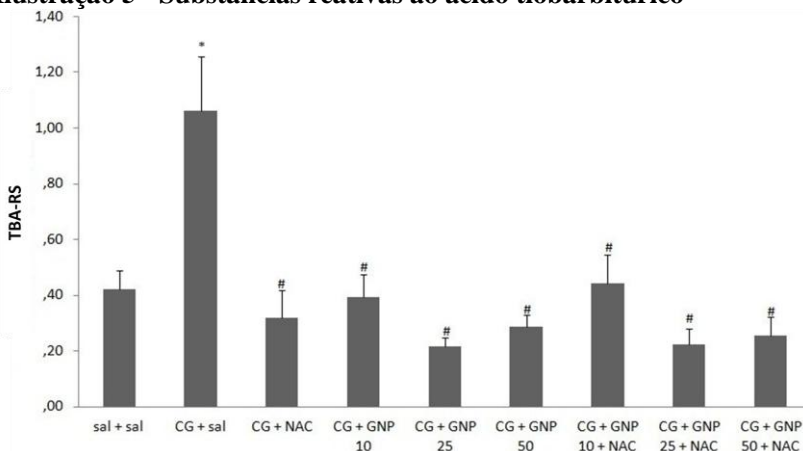
Fonte: do autor

Atividade da Mieloperoxidase no tecido pulmonar de ratos submetidos à administração de carragenina e tratados com NAC 20 mg/Kg e/ou GNP 10, 25 e 50 mg/Kg. Os resultados são expressos com média \pm desvio padrão, $n=8$ animais por grupo; * $p<0,05$ comparado com o grupo sal + sal; # $p<0,05$ comparado com o grupo CG + sal; % $p<0,05$ comparado com grupo CG + GNP 25 mg/Kg.

4.2 PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO

Para os níveis de danos oxidativo, a administração de CG aumentou os níveis de TBA-RS e grupamentos carbonila (ilustrações 5 e 6, respectivamente). Todos os tratamentos são eficazes na redução de TBA-RS, enquanto para os grupamentos carbonila observou-se que os grupos 4, 5 e 6 são eficazes na diminuição destes níveis, porém o mesmo não acontece nos grupos 3, 8, 9 e 10.

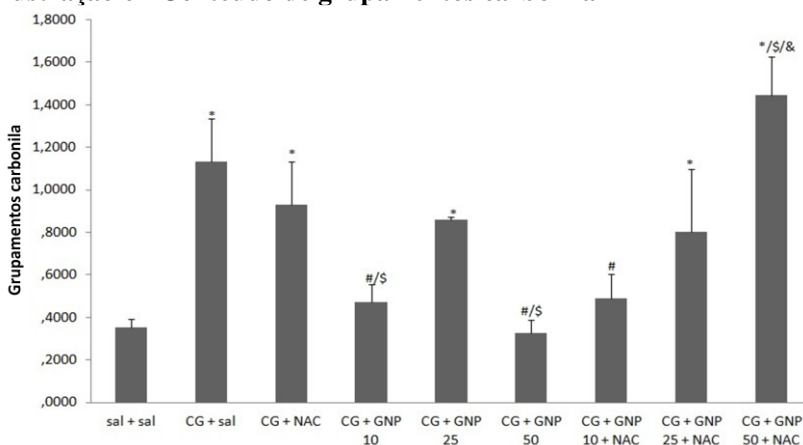
Ilustração 5 - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico



Fonte: do autor

Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico – Níveis no tecido pulmonar de ratos submetidos a administração de carragenina e tratados com NAC 20 mg/Kg e/ou GNP 10, 25 e 50 mg/Kg. Os resultados são expressos com média ± desvio padrão, n=8 animais por grupo; * p<0,05 comparado com o grupo sal +sal; # p<0,05 comparado com o grupo CG + sal.

Ilustração 6 - Conteúdo de grupamentos carbonila



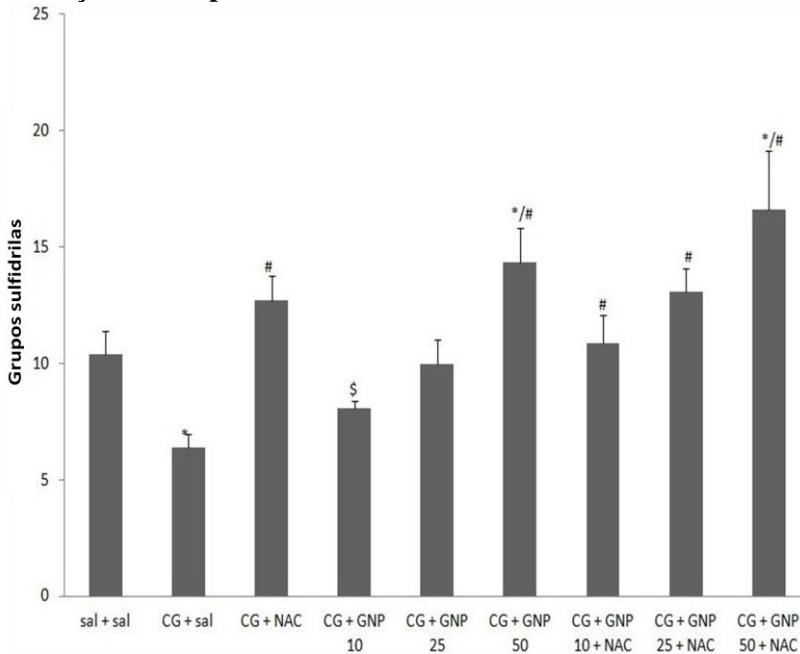
Fonte: do autor

Conteúdo de grupamentos carbonila – Níveis no tecido pulmonar homogeneizado de ratos submetidos à administração de carragenina e tratados com NAC 20 mg/Kg e/ou GNP 10, 25 e 50 mg/Kg. Os resultados são expressos

com média \pm desvio padrão, n=8 animais por grupo; * p<0,05 comparado com o grupo sal + sal; # p<0,05 comparado com o grupo CG + sal; \$ p<0,05 comparado com o grupo CG + NAC; % p<0,05 comparado com grupo CG + GNP 25 mg/Kg; & p<0,05 comparado com o grupo CG + GNP 50 mg/Kg.

Dano às proteínas em grupamento SH (ilustração 7), o grupo CG + salina foi observado com um decréscimo na integridade da proteína que foi revertido pela administração de 50 mg/kg GNP (grupo 6) e todas as outras doses de GNP associadas com NAC.

Ilustração 7 - Grupos sulfidrilas

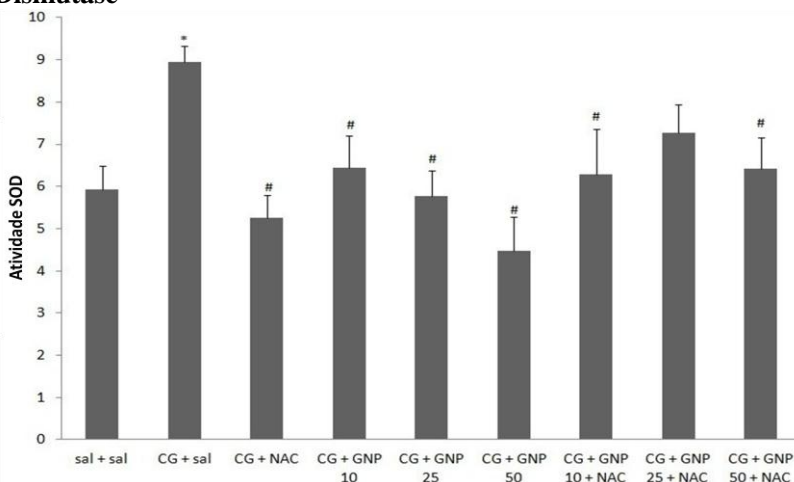


Fonte: do autor

Grupos sulfidrilas – Níveis no tecido pulmonar homogeneizado de ratos submetidos à administração de carragenina e tratados com NAC 20 mg/Kg e/ou GNP 10, 25 e 50 mg/Kg. Os resultados são expressos com média \pm desvio padrão, n=8 animais por grupo; * p<0,05 comparado com o grupo sal + sal; # p<0,05 comparado com o grupo CG + sal; \$ p<0,05 comparado com o grupo CG + NAC; % p<0,05 comparado com grupo CG + GNP 25 mg/Kg; & p<0,05 comparado com o grupo CG + GNP 50 mg/Kg.

As ilustrações 8, 9 e 10 mostram a atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPX respectivamente. Neste sentido, a atividade da SOD aumenta no grupo CG em relação ao grupo salina, sendo reduzido em todos os tratamentos (ilustração 8), este resultado é repetido para os níveis de CAT (ilustração 9). Enquanto que, ao avaliar os níveis de GPX, adicionalmente observamos um aumento no grupo CG (grupo 2) em relação à solução salina (grupo 1), no entanto, o grupo NAC e NAC em associação com GNP, em doses de 25 e 50 mg/kg potencializam este aumento enquanto GNP 50 mg/kg e NAC + GNP 10 mg/kg reduziram tais níveis (ilustração 10).

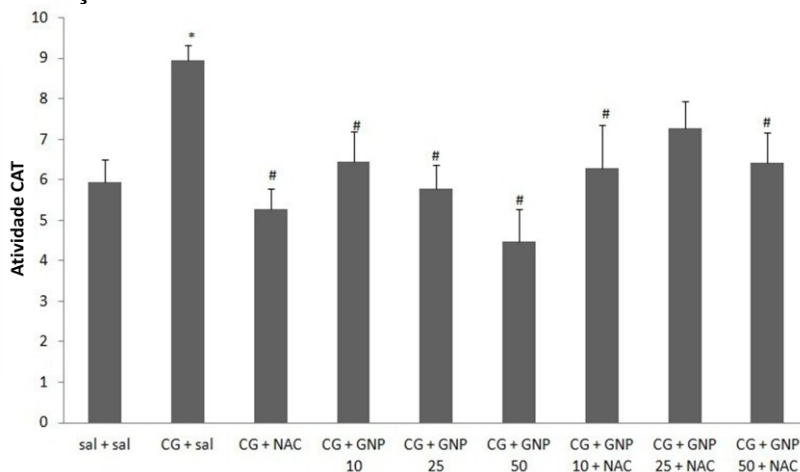
Ilustração 8 - Atividade da enzima antioxidante Superóxido Dismutase



Fonte: do autor

Atividade da enzima antioxidante Superóxido Dismutase - Níveis no tecido pulmonar homogeneizado de ratos submetidos a administração de carragenina e tratados com NAC 20 mg/Kg e/ou GNP 10, 25 e 50 mg/Kg. Os resultados são expressos com média \pm desvio padrão, n=8 animais por grupo; * p<0,05 comparado com o grupo sal +sal; # p<0,05 comparado com o grupo CG + sal.

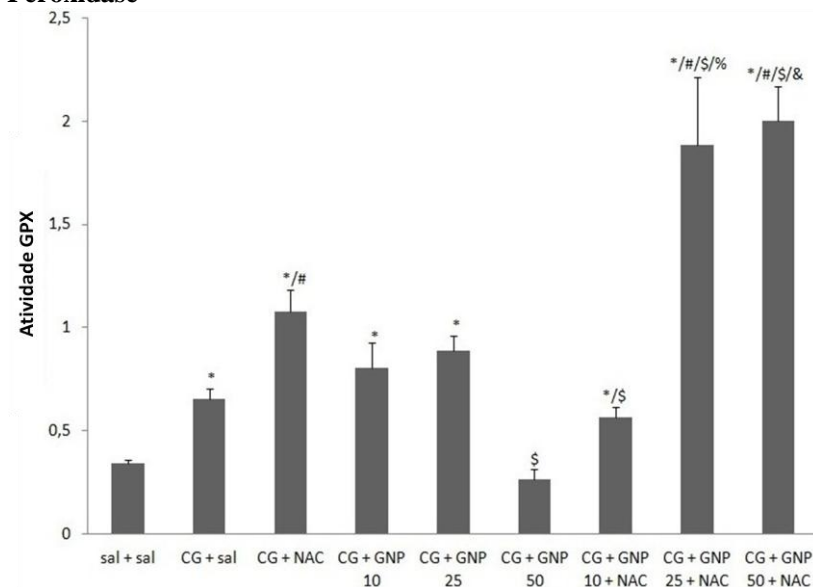
Ilustração 9 - Atividade da enzima antioxidante Catalase



Fonte: do autor

Atividade da enzima antioxidante Catalase – Níveis no tecido pulmonar homogeneizado de ratos submetidos a administração de carragenina e tratados com NAC 20 mg/Kg e/ou GNP 10, 25 e 50 mg/Kg. Os resultados são expressos com média \pm desvio padrão, n=8 animais por grupo; * p<0,05 comparado com o grupo sal +sal; # p<0,05 comparado com o grupo CG + sal.

Ilustração 10 - Atividade da enzima antioxidante Glutathiona Peroxidase



Fonte: do autor

Atividade da enzima antioxidante Glutathiona Peroxidase – Níveis no tecido pulmonar homogeneizado de ratos submetidos à administração de carragenina e tratados com NAC 20 mg/Kg e/ou GNP 10, 25 e 50 mg/Kg. Os resultados são expressos com média ± desvio padrão, n=8 animais por grupo; * p<0,05 comparado com o grupo sal + sal; # p<0,05 comparado com o grupo CG + sal; \$ p<0,05 comparado com o grupo CG + NAC; % p<0,05 comparado com grupo CG + GNP 25 mg/Kg; & p<0,05 comparado com o grupo CG + GNP 50 mg/Kg

5 DISCUSSÃO

Neste estudo, foram relatados os efeitos de GNP em um modelo animal bem estabelecido para a inflamação aguda induzida por CG e a sua associação com NAC, um composto antioxidante bem conhecido (Cuzzocrea et al., 2001). A NAC possui um grupo tiol, e é precursora de L-cisteína e glutathiona reduzida. Em sistemas biológicos, o aminoácido cisteína combina a atividade catalítica com uma extensa química redox e propriedades únicas de ligação com metais (Giles et al., 2003). A NAC é uma fonte de grupos sulfidrila nas células, que por sua vez combatem os radicais livres através de sua interação com o radical hidroxila (Aruoma et al., 1989). A proteína de cisteína é, portanto, capaz de agir como “interruptor redox”, fornecendo um “depósito” de íons metálicos, controlando assim a atividade de metaloproteínas, participando em importantes vias de regulação e de sinalização (Giles et al., 2003).

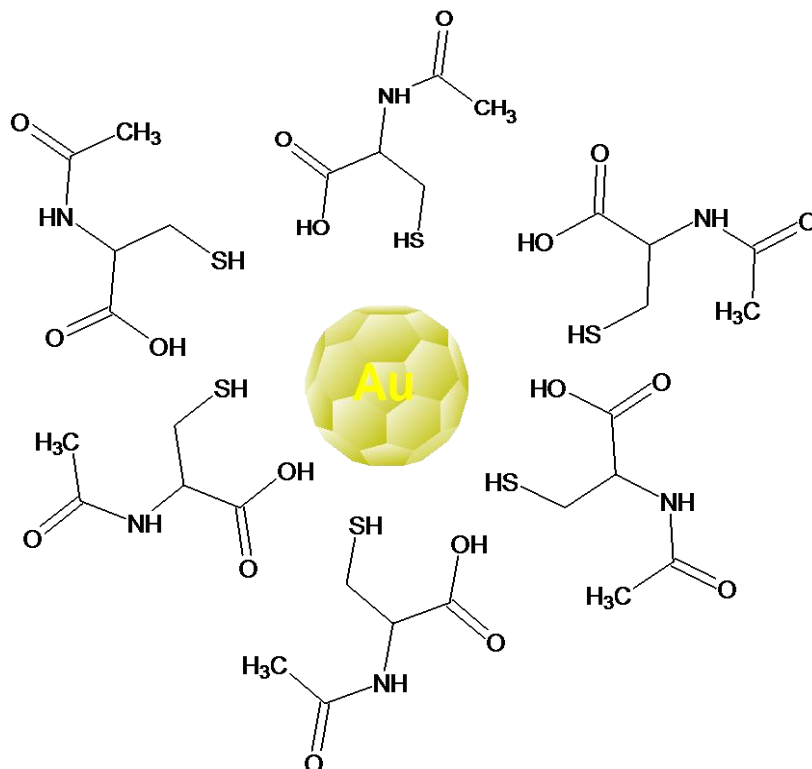
Devido a sua atividade redox e propriedades de ligação metálica a cisteína é um elemento essencial para muitas proteínas e um componente chave da função catalítica de enzimas (Giles et al., 2003). Estudos observaram que na lesão ocorre ativação dos neutrófilos devido à fagocitose, amplificando este processo inflamatório, podendo conduzir a liberação de EROs. Neutrófilos contêm enzimas hidrolíticas e moléculas tóxicas em seus grânulos que podem gerar vários oxidantes (Toumi e Best, 2003).

Assim as EROs que podem ser geradas nos processos inflamatórios, sendo produzidas na cadeia respiratória mitocondrial, são combatidas pelas defesas antioxidantes, enzimáticas e não enzimáticas, que atuam contra a toxicidade dessas espécies, sendo responsáveis pelo controle entre a eliminação e produção de EROs. Porém na lesão ocorre o aumento exacerbado destas espécies, ultrapassando a capacidade antioxidante normal do organismo e pode até mesmo gerar um déficit das defesas antioxidantes, favorecendo o aumento do estresse oxidativo (Bondy e Lebel, 1993), sendo assim nanopartículas de ouro vem sendo usadas no auxílio ao combate do estresse oxidativo e os seus efeitos adversos (BarathManiKanth et al., 2010), enquanto que a diversidade de múltiplos papéis da cisteína *in vivo* é tão fascinante como ela pode ser promissora para pesquisas futuras nas áreas bioquímicas e farmacológicas relacionadas ao estresse oxidativo (Giles et al., 2003).

Metais e seus respectivos íons desempenham importante papel na modulação redox da cisteína. A ilustração 11 corresponde a uma representação esquemática da interação entre moléculas de NAC e uma GNP via grupos -SH. O nosso modelo é baseado no diagrama

esquemático proposto por Giles et al. (2003) para interação entre grupo $-SH$ e Zn .

Ilustração 11 - Representação esquemática da interação GNP e NAC



Fonte: Giles et al. (2003)

Representação esquemática de uma nanopartícula de ouro circundada por moléculas de NAC. Observa-se os grupos $-SH$ direcionados para a GNP.

No presente trabalho, apenas a administração aguda de GNP foi suficiente para exibir pronunciadas ações anti-inflamatórias, caracterizado pela inibição de $IL-1\beta$ e $TNF-\alpha$, aumento dos níveis de $IL-10$ no exsudato pleural e diminuir o influxo de leucócitos para o pulmão em um modelo agudo de inflamação causado pela administração intrapleural de CG.

O GNP provocou importante ação contra danos oxidativo em lipídeos, carbonilação de proteínas e dependência dos grupos -SH livres associados com o perfil de diminuição de enzimas antioxidantes. Tomados em conjunto, estes resultados sugerem que a administração de GNP pode efetivamente interferir com o processo inflamatório na pleurite induzida pela CG.

Estudos demonstram que as EROs, quando exacerbadas, podem gerar danos celular, prejudicando o processo de cicatrização de feridas (Halliwell e Gutteridge, 1985; Gorkturk et al., 1995). Sendo assim em uma lesão, a combinação do aumento exacerbado das EROs e uma diminuição dos antioxidantes geram atraso no processo de cicatrização, portanto a lesão deve ser restaurada o mais rapidamente (Cheng et al., 1982). Uma resposta inflamatória aguda abreviada e menos intensa, gera uma melhor regeneração tecidual, e diminui os eventos de estresse oxidativo que se encontram aumentados na lesão, favorecendo e restaurando os níveis das defesas antioxidantes (Toumi e Best, 2003).

A inflamação é normalmente caracterizada pela ativação de macrófagos residentes e células epiteliais e o recrutamento e ativação de células, tais como neutrófilos, eosinófilos, monócitos e linfócitos (Lunardelli et al, 2006). Assim, as respostas celulares imunes parecem ser os mecanismos predominantes envolvidos na patogênese da inflamação. A Pleurite induzida por CG é um modelo bem estabelecido de inflamação experimental caracterizado por um acúmulo de líquidos (edema) com uma grande quantidade de células polimorfonucleares (PMNs) (Saleh et al., 1999).

A penetração de nanopartículas em membranas celulares é facilitada por sua escala nanométrica, podendo ser utilizada em diferentes aplicações biomédicas (Ghosh et al., 2008). Estudos vêm demonstrando que a estabilidade das GNPs está relacionada com seu potencial zeta, interagindo com diversas proteínas e aminoácidos através da sua afinidade por grupos tióis e aminos, presentes nestes componentes químicos (Zhou et al., 2009). Assim, pesquisadores têm utilizado ferramentas farmacológicas para demonstrar as propriedades anti-inflamatórias do GNP (Dohnert et al., 2012; Victor et al., 2012).

Durante a inflamação aguda sérica leucócitos migram para as áreas de lesão tecidual (Paul et al., 2009). Como esperado, a injeção intra pleural de GC induz uma reação inflamatória aguda, caracterizada por infiltração de células polimorfonucleares marcado no tecido pulmonar. O tratamento de ratos com GNP atenuou a atividade da MPO induzida por administração de CG. É importante notar que o padrão de resultados foi semelhante ao do apresentado pela NAC sozinho e

associação de GNP + NAC. Porém os grupos 8 e 9 apresentaram diferenças significativas, pois, no grupo 8 o tratamento foi eficaz e no grupo 9 que recebeu 25 mg/Kg a mais de GNP o tratamento não foi eficaz, isso se deve provavelmente ao fato de que o GNP em doses mais elevadas tenha maior instabilidade na interação entre os GNPs e entre os GNPs e o fármaco, neste caso a NAC, sendo portanto diferente da interação que ocorre em doses menos concentradas. O potencial zeta é o que mantém o GNP estável, as partículas que trabalham neste experimentam apresentam o potencial zeta de -35 mV o que confere ao GNP bastante estabilidade, porém, estudos em curso no Laboratório de Síntese de Complexos Multifuncionais (LASICOM) estão sendo observados que a adição de NAC na solução de GNP faz com que o potencial zeta das mesmas passem de negativo para positivo, estudos posteriores comprovaram esta hipótese. A diminuição da atividade da MPO pode confirmar também o efeito inibitório sobre os neutrófilos, uma vez que esta enzima pró-inflamatória pode refletir a ativação de neutrófilos no local da lesão no modelo de pleurite induzida por CG em ratos (Froede et al., 2001). As GNPs são conhecidas por terem possibilidades terapêuticas promissoras, devido as suas propriedades importantes, como biocompatibilidade, reatividade de superfície elevada e resistência à oxidação (BarathManiKanth et al., 2010).

A ativação de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α , IL-1 β são os principais mediadores do processo inflamatório e consequente dano inflamatório (Zhao et al., 2007). Os estudos mostraram também que o influxo de células para a cavidade pleural ocorre após a libertação de citocinas quimiotáticas por células mesoteliais, em resposta a outras citocinas, (Cuzzocrea et al., 2001; Oliveira et al., 2008). Existem evidências de que as citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β , ajudam a propagar a extensão de um processo inflamatório local ou sistêmico (Romano et al., 1997; Alonzi et al., 1998). Estas citocinas pró-inflamatórias estão relacionadas com a estimulação da quimiotaxia celular e induzir a expressão de moléculas de adesão (Borish e Steinke, 2003).

Os resultados demonstraram que o processo inflamatório causado pela administração de CG na cavidade pleural conduziu a um aumento substancial dos níveis de TNF- α e IL-1 β , no fluido pleural, e estes níveis eram significativamente mais baixos nos exsudatos obtidos em animais tratados com GNP. Estudos recentes demonstraram que nanopartículas metálicas são antioxidantes. Nanopartículas metálicas contendo ouro e platina auxiliam na eliminação de EROs (Victor et al., 2012). De fato, o GNP inibiu a migração de PMNs nos tecidos do pulmão, provavelmente

por diminuição da liberação de TNF- α e IL-1 β e o aumento da citocina anti-inflamatória IL-10 em GNP 10 mg/kg e associação de NAC + GNP 50 mg/kg. Neste contexto, os dados farmacológicos demonstraram que GNP inibiu significativamente estas citocinas em outros modelos animais de doenças inflamatórias (Dohnert et al., 2012; Victor et al., 2012).

No entanto, o presente estudo mostrou que a ação anti-inflamatória do GNP no modelo animal de pleurite pode ser explicado pela redução dos níveis de TNF- α e IL-1 β e aumento dos níveis de IL-10 no sítio da inflamação. Compostos de ouro têm recebido grande atenção como agentes anti-inflamatórios devido à sua capacidade para inibir a expressão de NF- κ B e subsequentes reações inflamatórias (Victor et al., 2012). Além disso, o efeito do GNP em diminuir os níveis de citocinas pró-inflamatórias foi semelhante ou superior à de NAC e a IL-10 foi potencializada com administração da NAC.

Por conseguinte, em uma tentativa de correlacionar os efeitos anti-inflamatórios observados em citocinas para o mecanismo de ação bioquímica conhecido do GNP (Menchón et al., 2012), danos oxidativo nos lipídios e os níveis de proteínas foram determinados no tecido pulmonar. Ficou evidenciado que o tratamento com GNP foi eficaz na diminuição da peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas induzidas por CG com efeito mais evidente que a NAC sozinha ou em associação, indicando que as propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias do GNP foram correlacionados. No entanto, observamos um efeito mais evidente da maior integridade de grupos SH com a administração da associação de NAC + GNP 50 mg/kg. Zafarullah et al., (2003) demonstraram que a NAC pode também fornecer grupos SH e sequestrar EROs o que pode explicar o resultado que nós obtivemos.

Finalmente, nós investigamos o efeito do GNP e a associação de GNP e NAC em defesas enzimáticas antioxidantes no pulmão de ratos, determinando SOD, CAT e GPX. A GSH participa de vários processos metabólicos no organismo. O índice de GSH no organismo é um forte indicador do respectivo estado fisiológico celular (Tapiero e Tew, 2003), onde a sua redução pode ocasionar danos a níveis celulares irreversíveis (Forman et al., 2009). De acordo com o nível de GSH intracelular pode-se prever a longevidade dessa célula (Park e You, 2010). Portanto a GSH tem importante ação na proteção contra o estresse oxidativo e desintoxicação de xenobióticos, e a sua biodisponibilidade é um fator chave para a manutenção da saúde celular. Assim uma quantidade diminuída de GSH acarretará em uma menor probabilidade de sobrevivência dessa célula (Forman et al., 2009).

A GSH é uma molécula que está presente em diversos processos, como antioxidante e desintoxicante, no transporte de aminoácidos, síntese de proteínas e ácidos nucleicos, manutenção da forma ativa de certas enzimas, proteção do organismo contra a exposição a radiações solares (Dringen, 1999; Forman et al., 2009; Park e You, 2010). Relativamente à GSH, tem um papel fundamental na resistência celular ao dano oxidativo. É um dos principais antioxidantes do organismo e tem um papel importante na metabolização/excreção de xenobióticos (Franklin, 2010).

No estudo observou-se que a CG aumentou a atividade das enzimas SOD e CAT e em todos os tratamentos testados estes níveis foram reduzidos. Embora a enzima antioxidante GPX, sabendo que sua atividade depende da GSH, o mais abundante tiol de baixo peso molecular em células de animais e para a síntese de GSH do tecido, a disponibilidade de cisteína é geralmente o fator limitante. Um dos precursores efetivos da cisteína é um derivado sintético, NAC (Atkuri et al., 2007) o que parece explicar os elevados níveis encontrados quando injetado este composto e além disso GNP 50 mg/kg é eficaz na redução dos níveis de GPX. Uma série de enzimas, tais como GR requerem resíduos de cisteína redox ativas para a sua atividade (Giles et al., 2003). Transformações redox são importantes em muitas doenças humanas, entre elas doenças relacionadas ao estresse oxidativo. O desenvolvimento de drogas altamente antioxidantes pode ser uma saída promissora para o controle de alguns desses problemas. Além disso, uma melhor compreensão de como o processo redox celular acontece também pode abrir um caminho para geração de drogas com alto grau de especificidade o que ainda não está disponível no momento.

6 CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou que a ação anti-inflamatória do GNP no modelo animal de pleurite pode ser explicado pela redução dos níveis de TNF- α e IL-1 β e aumento dos níveis de IL-10 no sítio da inflamação. Além disso, o efeito do GNP em diminuir os níveis de citocinas pró-inflamatórias foi semelhante ou superior aos de NAC e a IL-10 foi potencializada com administração da NAC.

Foi mostrado que o tratamento com GNP foi eficaz na diminuição da peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas induzidas por CG mais efetivamente do que a NAC sozinho ou em associação nas doses estudadas, indicando que as propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias do GNP foram correlacionadas.

Finalmente, o GNP tem um importante efeito anti-inflamatório por inibição do influxo de leucócitos, citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β) redução dos níveis de atividade da MPO e aumento dos níveis de citocina anti-inflamatória IL-10. A propriedade antioxidante do GNP pode estar relacionada, pelo menos em parte, à ação anti-inflamatória do presente composto e, por fim, propõe-se que as moléculas nanoparticuladas, tais como GNP podem ser úteis no tratamento de condições associadas com inflamação local.

REFERÊNCIAS

- AEBI H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984; 105: 121–126.
- ALBERT ML, SAUTER B, BHARDWAJ N. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature.* 1998; 392(6671): 86-9.
- ALLEN LA, ADEREM A. Mechanisms of phagocytosis. *Curr Opin Immunol.* 1996; 8(1): 36-40.
- ALONZI T, FATTORI E, CAPPELLETTI M, CILIBERTO G, POLI V. Impaired stat3 activation following localized inflammatory stimulus in IL-6 deficient mice. *Cytokine.* 1998; 10(1): 13–8.
- AL-SARIH B, EREMIN O. Tumor-associated macrophages (TAMs): disordered function, immune suppression and progressive tumor growth. *J R Coll Surg Edinb.* 2000; 45(1): 1-16.
- ARUOMA OL, HALLIWELL B, HOEY BM, BUTLER J. The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med.* 1989; 6(6): 593-7.
- ATKURI KR, MANTOVANI JJ, HERZENBERG LA, HERZENBERG LA. N-Acetylcysteine -- a safe antidote for cysteine/glutathione deficiency. *Curr Opin Pharmacol.* 2007; 7(4): 355-9.
- BANNISTER JV, CALABRESE L. Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem. Anal.* 1987; 32: 279–312.
- BARATHMANIKANTH S, KALISHWARALAL K, SRIRAM M, PANDIAN SRK, YOUN HS, EOM S, GURUNATHAN S. Anti-oxidant effect of gold nanoparticles restrains hyperglycemic conditions in diabetic mice. *J Nanobiotechnology.* 2010; 8(16): 1-15.
- BIESALSKI, H. K. The role of Antioxidants in Nutritional Support. *Nutr.* 2000; 16 (7-8): 593–596.

BONDY SC, LEBEL CP, The relationship between excitotoxicity and oxidative stress in the central nervous system. *Free Radic Biol Med* 1993; 14(6): 633-642.

BONNEFOY, M.; DRAY, J.; KOSTKA, T. Antioxidants to slow aging, facts and perspectives. *Presse Med.* 2002; 31(25): 1174-84.

BORISH LC, STEINKE JW. Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin Immunol.* 2003; 111: 460-75.

CHENG N, HOOF HV, BOCKX E, HOOGMARTENS MJ, MULIER JC, DE DIJCKER FJ, SANSEN WM, DE LOECKER W. The effects of electric currents on ATP generation, protein synthesis, and membrane transport of rat skin. *Clin Orthop.* 1982; 171: 264-72.

COTRAN RS, KUMAR V, COLLINS, T. *Patologia Estrutural e Funcional.* 6ª ed. Rio de Janeiro (RJ): Guanabara Koogan, c2000. 1251 p.

COUSSENS LM, WERB Z. Inflammation and cancer. *Nature.* 2002; 420: 860-867.

CUZZOCREA S, MAZZON E, DUGO L, SERRAINO I, CICCOLO A, CENTORRINO T, DE SARRO A, CAPUTI AP. Protective effects of n-acetylcysteine on lung injury and red blood cell modification induced by carrageenan in the rat. *FASEB J.* 2001; 15(7): 1187-1200.

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.

DIEBOLD Y, CALONGE M. Applications of nanoparticles in ophthalmology. *Prog Retin Eye Res.* 2010; 29(6): 596-609.

DOHNERT MB, VENÂNCIO M, POSSATO JC, ZEFERINO RC, DOHNERT LH, ZUGNO AI, DE SOUZA CT, PAULA MM, LUCIANO TF. Gold nanoparticles and diclofenac diethylammonium administered by iontophoresis reduce inflammatory cytokines expression in Achilles tendinitis. *Int J Nanomedicine.* 2012; 7: 1651-7.

DRAPER HH, HADLEY M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1990; 186: 421–31.

DRINGEN R. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog Neurobiol.* 1999; 62(6): 649-669

DURAN N, MATTOSO LHC, MORAIS PC. Nanotecnologia: introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação. 1ª ed. São Paulo (SP): Artliber, c2006. 208 p.

FADOK VA, BRATTON DL, KONOWAL A. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2 and PAF. *J Clin Invest.* 1998; 101(4): 890-8.

FILHO GB. *Bogliolo Patologia.* 6a Ed. Rio de Janeiro (RJ): Guanabara Koogan, c2000. 1328p.

FORMAN HJ, RINNA A, ZHANG H. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol Aspects Med.* 2009; 30(1-2): 1-12.

FRANKLIN CC. Enhanced glutathione: biosynthetic capacity promotes resistance to AS3+- induced apoptosis. *Toxicol Lett.* 2010; 193(1): 33-40

FRIDOVICH I. Oxygen toxicity: a radical explanation. *J Exp Biol.* 1998; 201: 1203-9.

FROEDE TS, MEDEIROS YS. Myeloperoxidase and adenosinedeaminase levels in the pleural fluid leakage induced by carraggenan in the mouse model of pleurisy. *Med Inflamm.* 2001; 10(4): 223–7.

GENESTRA M. Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cell Signal.* 2007; 19(9): 1807-19.

GHOSH P, HAN G, DE M, KIM CK, ROTELLO VM. Gold nanoparticles in delivery applications. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008; 60(11): 1307–15.

GILES KM, ROSS K, ROSSI AG. Glucocorticoid augmentation of macrophage capacity for phagocytosis of apoptotic cells is associated with reduced p130Cas expression, loss of paxillin/pyk2 phosphorylation and high levels of active rac. *J Immunol.* 2001; 167(2): 976-86.

GILES NM, WATTS AB, GILES GI, FRY FH, LITTLECHILD JA, JACOB C. Metal and redox modulation of cysteine protein function. *Chem Biol.* 2003; 10(8): 677-93.

GILMAN AG, GOODMAN LS, RALL TW, MURAD F. Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 11a ed. Rio de Janeiro (RJ): McGraw-Hill, c2006. 2021 p.

GOETZ, ME, LUCH A. Reactive species: A cell damaging route assisting to chemical carcinogens. *Canc. Lett.* 2008; 266(1): 73–83.

GORKTURK E, TURGUT A, BAYCU Cl. Oxygen free radicals impair fracture healing in rats. *Acta Orthop Scand.* 1995; 66(5): 473–5.

GRACE NA, PANDIAN K. Antibacterial efficacy of aminoglycosidic antibiotics protect gold nanoparticles – A brief study. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.* 2007; 297(1): 63-70.

GREB E. Pequeno milagre: estratégias em nanopartículas para medicamentos biológicos. *Pharm Technol Br.* 2008; 8(6): 6–10.

HALLIWELL B, GUTTERIDGE, J. Free radicals in biology and medicine. *Free Radic Biol Med.* 1985; 1(4): 331-332

KEEL M, UNGETHM U, STECKHOLZER U. Interleukin-10 counterregulates proinflammatory cytokine-induced inhibition of neutrophil apoptosis during severe sepsis. *Blood.* 1997; 90(9): 3356-63.

KHARB V, BHATIA M, DUREJA H, KAUSHIK D. Tecnologia das nanopartículas na liberação de princípios ativos fracamente solúveis em água. *Pharm Technol Br.* 2006; 10(6): 6–16.

KWIATKOWSKA K, SOBOTA A. Signaling pathways in Phagocytosis. *BioEssays.* 1999; 21: 422-431.

LEE MF, CHAN CY, HUNG HC, CHOU IT, YEE AS, HUANG CY. N-acetylcysteine (NAC) inhibits cell growth by mediating the EGFR/Akt/HMG box-containing protein 1 (HBP1) signaling pathway in invasive oral cancer. *Oral Oncol.* 2013; 49(2): 129-35.

LENTSCH AB, WARD PA. Regulation of experimental lung inflammation. *Respir Physiol.* 2001;128(1):17–22.

LEVINE RL, GARLAND D, OLIVER CN, AMICI A, CLIMENT I, LENZ AG. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 1990; 186: 464–78.

LIU Y, COUSIN JM, HUGHES J. Glucocorticoids promote non phlogistic phagocytosis of apoptotic leukocytes. *J Immunol.* 1999; 162: 3639-3646.

LOWRY OH, ROSEBROUGH AL, RANDAL RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193: 265–75.

LUNARDELLI A, LEITE CE, PIRES MGS, OLIVEIRA JR. Extract of the bristles of *Dirphia* sp. increases nitric oxide in a rat pleurisy model. *Inflamm Res.* 2006; 55(4): 129–35.

MCCUTCHEON JC, HART SP, CANNING M. Regulation of macrophage phagocytosis of apoptotic neutrophils by adhesion to fibronectin. *J Leukoc Biol.* 1998; 64(5): 600-7.

MENCHÓN C, MARTÍN R, APOSTOLOVA N, VICTOR VM, ALVARO M, HERANCE JR, GARCÍA H. Gold nanoparticles supported on nanoparticulate ceria as a powerful agent against intracellular oxidative stress. *Small.* 2012; 8(12): 1895-903.

MONAGHAN P, METCALFE NB, TORRES R. Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: mechanisms, measurements and interpretation. *Ecol. Lett.* 2009; 12(1): 75-92.

NANTEL F, DENIS D, GORDON R, NORTHEY A, CIRINO M, METTERS KM, CHAN CC. Distribution and regulation of

cyclooxygenase-2 in carrageenan-induced inflammation. *Br J Pharmacol.* 1999; 128(4): 853–9.

NEWMAN SL, TUCCI MA. Regulation of human monocyte/macrophage function by extracellular matrix. Adherence of monocytes to collagen matrices enhances phagocytosis of opsonised bacteria by activation of complement receptors and enhancement of Fc receptor function. *J Clin Invest.* 1990; 86(3): 703-714.

OLIVEIRA SHP, CANETTI C, RIBEIRO RA, CUNHA FQ. Neutrophil migration induced by IL-1b depends upon LTB4 released by macrophages and upon TNF-a and IL-1b released by mast cells. *Inflammation.* 2008; 31(1): 36–46.

PARK WH, YOU BR. Gallic acid induced lung cancer cell death is related to glutathione; depletion as well as reactive oxygen species increase. *Toxicol in Vitro.* 2010; 24(5): 1356-62

PAUL EL, LUNARDELLI A, CABERLON E, OLIVEIRA CB, SANTOS RCV, BIOLCHI V, BASTOS CMA, MOREIRA KB, NUNES FB, GOSMANN G, OLIVEIRA JR. Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of *Baccharis trimera* aqueous extract on induced pleurisy in rats and lymphoproliferation in vitro. *Inflammation.* 2009; 32(6): 419–25.

PAWLAK W, KEDZIORA J, ZOLYNSKI K, KEDZIORA-KORNATOWSKA K, BLASZCZYK J, WITKOWSKI P. Free radicals generation by granulocytes from men during bed rest. *J Gravit Physiol.* 1998; 5(1): 131-2

PEDERSEN MO, LARSEN A, PEDERSEN DS, STOLTENBERG M, PENKOWA M. Metallic gold reduces TNF α expression, oxidative DNA damage and pro-apoptotic signals after experimental brain injury. *Brain Res.* 2009; 1271: 103-113.

PEREIRA R, MEDEIROS YS, FRÖDE TS. Antiinflammatory effects of Tacrolimus in a mouse model of pleurisy. *Transpl Immunol.* 2006; 16: 105-111.

POWERS SK, JACKSON MJ. Exercise-Induced Oxidative Stress: Cellular Mechanisms and Impact on Muscle Force Production. *Physiol Rev.* 2008; 88(4): 1243–76.

PROOST P, WUYTS A, VAN DAMME J. The role of chemokines in inflammation. *Int J Clin Lab Res.* 1996; 26: 211-223.

QUINA FH. Nanotecnologia e o meio ambiente: perspectivas e riscos. *Quim Nova.* 2004; 27(6): 1028-1029.

REN Y, SAVILL J. Proinflammatory cytokines potentiate thrombospondin mediated phagocytosis of neutrophils undergoing apoptosis. *J Immunol.* 1995; 154(5): 2366-2374.

RIDDLES PW, BLAKELEY RL, ZERNER B. Reassessment of Ellman's reagent. *Methods Enzymol.* 1983;91:49–60

ROMANO M, SIRONI M, TONIATTI C, POLENTARUTTI N, FRUSCELLA P, GHEZZI P, FAGGIONI R, LUINI W, HINSBERGH V, SOZZANI S, BUSSOLINO F, POLI V, CILIBERTO G, MANTOVANI A. Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. *Immunity.* 1997; 6(3): 315–25.

ROSSI AG, MCCUTCHEON JC, ROY, N. Regulation of macrophage phagocytosis of apoptotic cells by camp. *J Immunol.* 1998; 160(7): 3562–3568.

ROTH J, RUMMEL C, BARTH, SW, GERSTBERGER R, HÜBSCHLE, T. Molecular aspects of fever and hyperthermia. *Immunol Allergy Clin N Am.* 2009; 29: 229-245.

SALEH TSF, CALIXTO JB, MEDEIROS YS. Effects of antiinflammatory drugs upon nitrate and myeloperoxidase levels in the mouse pleurisy induced by carrageenan. *Peptides.* 1999; 20(8): 949–56.

SALVEMINI D, WANG ZQ, BOURDON DM, STERN MK, CURRIE MG, MANNING PT. Evidence of peroxyxynitrite involvement in the carrageenan-induced rat paw edema. *Eur J Pharmacol.* 1996; 303(3): 217–20.

SIES H. Strategies of antioxidant defence. Review. *Eur J Biochem.* 1993; 215(2): 213-219.

SONAVANE G, TOMODA K, SANO A, OHSHIMA H, TERADA H, MAKINO K. In vitro permeation of gold nanoparticle through rat skin and rat intestine: Effect of particle size. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2008; 65(1): 1-10.

SOTO KF, CARRASCO A, POWELL TG, MURR LE, GARZA KM. Biological effects of nanoparticulate materials. *Sci Eng.* 2006; 26(8): 1421-1427.

SPINOSA HS, GÓRNIK SL, BERNARDI, MM. *Farmacologia aplicada a Medicina Veterinária.* 4a ed. Rio de Janeiro (RJ): Guanabara Koogan, c2006. p. 918.

STEPHENS JW, KHANOLKAR MP, BAIN SC. The biological relevance and measurement of plasma markers of oxidative stress in diabetes and cardiovascular disease. *Atherosclerosis*, 2009; 202(2): 321–9.

STUART LM, EZEKOWITZ AB. Phagocytosis: elegant complexity. *Immunity.* 2005; 22(5): 539–550.

SWAN IC. Gold-based therapeutic agents. *Chem Rev.* 1999; 99(9): 2589-2600.

TAPIERO H, TEW KD. The importance of glutathione in human disease. *Biomed Pharmacother.* 2003; 57(3-4): 145-155

TOUMI H, BEST TM. The inflammatory response: friend or enemy for muscle injury? *Br J Sports Med.* 2003; 37(4): 284-286.

TSAI CY, SHIAU AL, CHEN SY, CHEN YH, CHENG PC, CHANG MY, CHEN DH, CHOU CH, WANG CR, WU CL. Amelioration of Collagen-Induced Arthritis in Rats by Nanogold. *Arthritis Rheum.* 2007; 56(2): 544-554.

TURKEVICH J, STEVENSON P, HILLIER J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Faraday Discuss.* 1951; 11: 55–60.

VICTOR EG, SILVEIRA PC, 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; 12: 10-11.

VINEGAR R, TRAUJ JF, SELPH JL. Some quantitative temporal characteristics of carrageenan-induced pleurisy in the rat. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1943; 143: 711-4.

VINEGAR R, TRUAX JF, SELPH JL, VOELKER FA. Pathway of onset, development, and decay of carrageenan pleurisy in the rat. *Fed Proc*. 1982; 41(9): 2588-95.

VOLL RE, HERRMANN M, ROTH EA. Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature*. 1997; 390: 350-351.

WAHL LM, KLEINMAN HK. Tumor-associated macrophages as targets for cancer therapy. *J Natl Cancer Inst*. 1998; 90(21): 1583-4.

WARD PA. Oxidative stress: acute and progressive lung injury. *Ann N Y Acad Sci*. 2010; 1203: 53-9.

WENDEL A. Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol*. 1981; 77: 325-333.

YOUNG DLM, KHEIFETS JB, BALLARON SJ, YOUNG JM. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. *Agents Actions*. 1989; 26(3-4): 335-41.

ZAFARULLAH M, LI WQ, SYLVESTER J, AHMAD M. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cell Mol Life Sci*. 2003; 60: 6-20.

ZHANG SH, REDDICK RL, PIETRAHITA JA, MAEDA N. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein Science. 1992; 258(5081): 468-471.

ZHAO L, TAO JY, ZHANG SL, PANG R, JIN F, DONG JH, GUO YJ. Inner anti-inflammatory mechanisms of petroleum ether extract from *Melilotus suaveolens* Ledeb. *Inflammation*. 2007; 30(6): 213–23.

ZHOU J, RALSTO J, SEDEV R, BEATTIE DA. Functionalized gold nanoparticles: Synthesis, structure and colloid stability. *J Colloid Interface Sci*. 2009; 331(2): 251–62.