

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA – MESTRADO  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CLÍNICA INTEGRADA**

**MARIANE APARECIDA SAVI SANSON**

**AVALIAÇÃO DO PERFIL CITOTÓXICO E POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO DE  
NANOPARTÍCULAS DE OURO**

**PONTA GROSSA  
2016**

**MARIANE APARECIDA SAVI SANSON**

**AVALIAÇÃO DO PERFIL CITOTÓXICO E POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO DE  
NANOPARTÍCULAS DE OURO**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre na Universidade Estadual de Ponta Grossa, no curso de Mestrado em Odontologia – Área de concentração em Clínica Integrada. Linha de pesquisa: Etiologia, diagnóstico e tratamento de doenças bucais.

Orientador: Prof. Dr. Michel Fleith Otuki.

Co-orientadoras: Profa. Dra. Márcia Thaís Pochapski / UEPG  
Dra. Gabriela Kozuchovski Ferreira / UFPR

**PONTA GROSSA  
2016**

**Ficha Catalográfica**  
**Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG**

S229 Sanson, Mariane Aparecida Savi  
Avaliação do perfil citotóxico  
epotencial anti-inflamatório de  
nanopartículas de ouro/ Mariane Aparecida  
Savi Sanson. Ponta Grossa, 2016.  
91f.

Dissertação (Mestrado em Odontologia -  
Área de Concentração: Clínica Integrada),  
Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Michel Fleith  
Otuki.

Coorientadora: Profª Drª Márcia Thaís  
Pochapski.

Coorientadora: Profª Drª Gabriela  
Kozuchovski Ferreira.

1.Nanopartículas. 2.Inflamação.  
3.Toxicidade. I.Otuki, Michel Fleith. II.  
Pochapski, Márcia Thaís. III. Ferreira,  
Gabriela Kozuchovski. IV. Universidade  
Estadual de Ponta Grossa. Mestrado em  
Odontologia. V. T.

CDD: 617.695

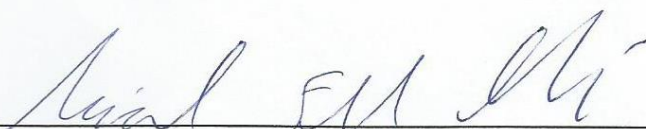
## TERMO DE APROVAÇÃO

**MARIANE APARECIDA SAVI SANSON**

### **AVALIAÇÃO DO PERFIL CITOTÓXICO E POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO**

Dissertação apresentada como pré-requisito para obtenção do título de Mestre na Universidade Estadual de Ponta Grossa, no Curso de Mestrado em Odontologia – Área de Concentração em Clínica Integrada.

Ponta Grossa, 16 de fevereiro de 2016



---

Prof. Dr. Michel Fleith Otuki - Orientador  
Universidade Estadual de Ponta Grossa/UEPG



---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Relia Tainá Mendes  
Centro de Ensino Superior dos Campos Gerais/CESCAGE



---

Prof. Dr. Fábio André dos Santos  
Universidade Estadual de Ponta Grossa/UEPG

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus por dar-me força, serenidade e perseverança para realização e conclusão do trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Odontologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa pela oportunidade de cursar o Mestrado.

Aos professores Michel Fleith Otuki, Márcia Thaís Pochapski e Gabriela Kozuchovski Ferreira pela contribuição com seus conhecimentos e sugestões na orientação ao longo do desenvolvimento do trabalho.

Aos professores Daniel Fernandes, Eduardo Baulm Campagnoli, Fábio André dos Santos, Gilson Cesar Nobre Franco e Giovani Marino Favero pelos esclarecimentos, conhecimentos e sugestões essenciais para a elaboração do trabalho.

Aos demais professores do Programa de Pós-Graduação pelo comprometimento e dedicação em contribuir para a formação de todos os discentes.

Aos alunos de Mestrado e Pós-Doutorado da UFPR, Gabriela, Carol, Bruna e Murilo, e a toda equipe do Laboratório de Farmacologia e Fisiopatologia da Pele (Laffpel) da Universidade Federal do Paraná pela companhia nos experimentos, troca de conhecimentos e contribuição essencial para o desenvolvimento do trabalho.

Aos meus colegas de Mestrado e Doutorado da Universidade Estadual de Ponta Grossa: Letícia, Reila, Adrian, Evelyn, Cindy, Luisa, Marcella, Paula e Jorge, que de alguma forma acrescentaram meu trabalho, pela amizade e por todos os momentos que compartilhamos durante esses dois anos.

Ao Complexo de Laboratórios Multiusuários (C-LABMU) da Universidade Estadual de Ponta Grossa e ao Laboratório de Síntese e Complexos Multifuncionais da Universidade do Extremo Sul Catarinense, pelo apoio técnico e com materiais essenciais para a execução da pesquisa.

À minha família, pelo exemplo e incentivo contínuos, durante todos os momentos alegres e difíceis de minha vida.

Ao William, pelo companheirismo, compreensão e incentivo durante todo o curso, além da companhia e ajuda nas infindáveis noites de laboratório.

E, finalmente, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (CAPES) do Ministério da Educação e Cultura pelo apoio financeiro.

Muito obrigada!

## DADOS CURRICULARES

### MARIANE APARECIDA SAVI SANSON

NASCIMENTO

19.05.1991

Ponta Grossa – Paraná – Brasil

FILIAÇÃO

Vilma Savi Sanson

Renato Sanson

2009-2013

Curso de Graduação em Odontologia

Universidade Estadual de Ponta  
Grossa – UEPG

2014-2015

Curso de Pós-Graduação. Nível de  
Mestrado em Odontologia, área de  
concentração em Clínica Integrada

Universidade Estadual de Ponta  
Grossa – UEPG

## RESUMO

SANSON MAS. **Avaliação do perfil citotóxico e potencial anti-inflamatório de nanopartículas de ouro.** [Dissertação de Mestrado em Clínica Integrada]. Ponta Grossa: Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2016.

Compostos de ouro já apresentam propriedades anti-inflamatórias estabelecidas pela literatura, além de importante potencial antioxidante. A utilização do ouro na forma nanoparticulada é uma aposta promissora para o tratamento de condições inflamatórias, como a doença periodontal, pelo seu mecanismo de ação. Apesar da biocompatibilidade estabelecida do ouro, é importante atentar-se para a possibilidade de efeito tóxico do ouro na forma nanoparticulada, devido a sua maior facilidade de penetrar nos tecidos e atravessar membranas, em resposta principalmente ao seu tamanho e concentração de ouro presente. O objetivo deste estudo foi a caracterização das nanopartículas de ouro (AuNPs) de 10, 20 e 30 nm utilizadas no trabalho, bem como testar seu efeito tóxico em modelos de inflamação aguda local *in vivo* (edema de orelha induzido por TPA e edema de pata induzido por LPS) e verificar sua citotoxicidade em cultura de fibroblastos (3T3) e macrófagos (RAW 264.7) murinos após 12, 24 e 48h pelos ensaios de MTT, VN e teste de exclusão do azul de tripan. Para a caracterização das AuNPs foram realizados os testes de espectroscopia no ultravioleta-visível (Uv-Vis), difratometria de raios-x, absorvância atômica, potencial zeta e microscopia eletrônica de varredura por canhão de emissão de campo elétrico (FEG). Os resultados dos testes de caracterização demonstraram que as nanopartículas apresentavam-se estáveis e realmente com os diâmetros de 10, 20 e 30 nm, como proposto pelo método de síntese, estando adequadas para a utilização nos testes subsequentes. No modelo de edema de orelha induzido por TPA as formulações de AuNPs em creme a 0,1% reduziu a formação do edema em 47,76%, enquanto a formulação em creme a 0,06% reduziu o edema em 33,72% após 6h. Após 24h todas as formulações testadas apresentaram redução da formação do edema, apresentando resultados sem diferença estatística em comparação ao grupo tratado com a dexametasona. No modelo de edema de pata induzido por LPS a formulação de AuNPs em creme a 0,1% foi capaz de reduzir a formação do edema em 84,46% e a formulação em creme a 0,6% reduziu em 86,57%, também sem apresentar diferença estatística em comparação ao grupo tratado com dexametasona. Quanto aos testes de viabilidade celular, os métodos do MTT e VN não foram capazes de obter resultados confiáveis, porém o teste de exclusão do azul de tripan indicou ausência de citotoxicidade das AuNPs em 12h nas culturas de fibroblastos e macrófagos. Após 24h de incubação, a maior concentração (35 mg/L) das dispersões de AuNPs nos 3 diâmetros testados reduziu a viabilidade de macrófagos, e os fibroblastos obtiveram seus valores de viabilidade celular diminuídos pela maioria das dispersões de AuNPs testadas. Após 48h de incubação, todas as concentrações e diâmetros testados das dispersões de AuNPs foram capazes de diminuir drasticamente as porcentagens de viabilidade celular tanto em fibroblastos quanto em macrófagos.

Palavras-chave: nanopartículas, inflamação, toxicidade.



## ABSTRACT

SANSON MAS. **Cytotoxic profile and anti-inflammatory potential evaluation of gold nanoparticles.** [Dissertação de Mestrado em Clínica Integrada]. Ponta Grossa: Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2016.

Gold compounds already demonstrated anti-inflammatory properties in previous studies, in addition to important antioxidant potential. The use of gold in nanoparticle form is promising for the treatment of inflammatory conditions such as periodontal disease, especially for its mechanism of action. Although the established gold biocompatibility, it is important to pay attention to the possible toxic effect of gold on nanoparticulate form, for its ease of penetration through the tissues and membranes, mainly in response to its size and gold concentration. The study purpose was the physical characterization of gold nanoparticles (AuNPs) of 10, 20 and 30 nm used in the experiments, in addition to test their topical effect in models of acute inflammation *in vivo* (ear edema TPA-induced and paw edema LPS-induced) and verify its cytotoxicity in fibroblasts and macrophages mice cell cultures after 12, 24 e 48 hours by MTT and Neutral Red assay and exclusion of trypan blue test. To characterize the AuNPs were performed the ultraviolet-visible spectroscopy, x-ray diffraction, atomic absorbance, zeta potential and Field Emission Gun Scanning Electron Microscopy (FEG). The characterization tests results shown that the nanoparticles are stable and truly presented the diameters of 10, 20 and 30 nm, as proposed by synthesis method, and so are suitable for use in subsequent experiments. In the ear edema TPA-induced model AuNPs cream formulation at 0.1% reduced edema formation at 47.76%, while the cream formulation at 0.06% reduced 33.72% of edema after 6 hours. After 24 hours all formulations tested showed a reduction of edema formation, presenting results with no statistical difference compared to the group treated with dexamethasone. In LPS-induced paw edema model the AuNPs cream formulation at 0.1% was able to reduce edema formation in 84.46% and cream formulation at 0.6% decreased 86.57%, also without showing statistical difference compared to the group treated with dexamethasone. In viability tests, the MTT and Neutral Red methods were not able to obtain reliable results, but exclusion trypan blue test indicated no cytotoxicity of AuNPs after 12h in fibroblasts and macrophages cell cultures. After 24h incubation, the dispersions of AuNPs in 3 diameters at the highest concentration (35 mg/L) reduced the macrophages viability and fibroblast viability decreased with most of the tested AuNPs dispersions. After 48h all tested AuNPs dispersions concentrations and diameters were able to reduce the percentages of fibroblasts and macrophages cell viability.

Keywords: nanoparticles, inflammation, tototoxicity.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1-	Expressão de TLRs nos tecidos periodontais.....	19
Figura 1-	Sinalização do TLR-4.....	21
Figura 2-	Papel do NF- $\kappa$ B como um regulador inflamatório.....	22
Figura 3-	Mecanismos celulares e moleculares da resposta imune do hospedeiro responsáveis pela progressão da doença periodontal	28
Figura 4-	Possível mecanismo de ação das AuNPs na diminuição das respostas celulares induzidas por IL-1 $\beta$ .....	39
Figura 5-	Representação esquemática dos mecanismos de ação anti-inflamatória e antioxidante propostos para as AuNPs.....	39
Figura 6-	Possíveis aspectos para avaliação <i>in vitro</i> da cicatrização e regeneração periodontal.....	41
Figura 7-	Coloração das dispersões de nanopartículas de ouro de 10, 20 e 30 nm.....	44
Figura 8-	Microscopia eletrônica de transmissão da AuNPs de 10, 20 e 30 nm.....	45
Figura 9-	Visualização dos fibroblastos 3T3 e macrófagos RAW 264.7 utilizados no estudo em microscópio invertido.....	53
Figura 10-	Contagem de células RAW 264.7 em câmara de Neubauer no teste de exclusão do azul de tripan.....	56
Figura 11-	Espectros eletrônicos de absorção na região do Uv-vis para as dispersões coloidais de ouro de 10, 20 e 30 nm.....	58
Figura 12-	Difratograma com padrão de DRX das AuNPs de 10, 20 e 30 nm.	59
Figura 13-	Formato esférico das AuNPs de 10, 20 e 30 nm representado através de Microscopia Eletrônica de Varredura por canhão de emissão de campo elétrico (FEG).....	61
Figura 14-	Efeito do tratamento com AuNPs no edema de orelha induzido por TPA após 6 e 24h.....	62
Figura 15-	Efeito do tratamento com AuNPs e creme não iônico (veículo) no edema de orelha induzido por TPA após 6 e 24h.....	64
Figura 16-	Efeito do tratamento com AuNPs em creme no edema de pata após 1h da indução do edema com LPS.....	64

Figura 17-	Viabilidade celular de fibroblastos 3T3 pelo método do MTT e Vermelho Neutro no período de 12 horas de incubação com as AuNPs de 10, 20 e 30 nm nas concentrações de 1,25; 5; 15 e 35 mg/L.....	66
Figura 18-	Viabilidade celular de fibroblastos 3T3 pelo método do MTT e Vermelho Neutro no período de 24 horas de incubação com as AuNPs de 10, 20 e 30 nm nas concentrações de 1,25; 5; 15 e 35 mg/L.....	66
Figura 19-	Viabilidade celular de fibroblastos 3T3 pelo método do MTT e Vermelho Neutro no período de 48 horas de incubação com as AuNPs de 10, 20 e 30 nm nas concentrações de 1,25; 5; 15 e 35 mg/L.....	67
Figura 20-	Viabilidade celular de fibroblastos 3T3 teste de exclusão do azul de tripan no período de 12, 24 e 48 horas de incubação com as AuNPs de 10, 20 e 30 nm nas concentrações de 1,25; 5; 15 e 35 mg/L.....	68
Figura 21-	Viabilidade celular de macrófagos RAW 264.7 pelo método do MTT e Vermelho Neutro no período de 12 horas de incubação com as AuNPs de 10, 20 e 30 nm nas concentrações de 1,25; 5; 15 e 35 mg/L.....	69
Figura 22-	Viabilidade celular de macrófagos RAW 264.7 pelo método do MTT e Vermelho Neutro no período de 24 horas de incubação com as AuNPs de 10, 20 e 30 nm nas concentrações de 1,25; 5; 15 e 35 mg/L.....	70
Figura 23-	Viabilidade celular de macrófagos RAW 264.7 pelo método do MTT e Vermelho Neutro no período de 48 horas de incubação com as AuNPs de 10, 20 e 30 nm nas concentrações de 1,25; 5; 15 e 35 mg/L.....	70
Figura 24-	Viabilidade celular de macrófagos RAW 264.7 pelo teste de exclusão do azul de tripan no período de 12, 24 e 48 horas de incubação com as AuNPs de 10, 20 e 30 nm nas concentrações de 1,25; 5; 15 e 35 mg/L.....	72

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Medidas do potencial Zeta das dispersões de AuNPs nos diâmetros de 10, 20 e 30 nm.....	60
Tabela 2-	Porcentagem de diminuição do edema de orelha após 6h e 24h do tratamento com diferentes formulações de AuNPs.....	63
Tabela 3-	Porcentagem de diminuição do edema de pata após 1h do tratamento com diferentes formulações de AuNPs.....	65

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINEs	Anti-inflamatórios não esteroidais
AuNPs	Nanopartículas de Ouro
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
COX-2	Ciclooxigenase-2
DMEM	Meio Eagle Modificado por Dulbecco, do inglês <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido, do inglês <i>Dimethyl Sulfoxide</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês <i>Desoxyribonucleic Acid</i>
eNOS	Óxido nítrico sintetase endotelial
E.P.M.	Erro padrão da média
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
HAuCl <sub>4</sub>	Ácido Tetracloroáurico
IFN- $\gamma$	Interferon gama
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 $\beta$
iNOS	Óxido nítrico sintetase induzida
LPS	Lipopolissacarídeo
MTT	Thiazolyl blue tetrazoliumbromide
NBT	Nitroazul de tetrazólio, do inglês <i>Nitroblue tetrazolium</i>
NF- $\kappa$ B	Fator Nuclear <i>kappa</i> B, do inglês <i>Factor Nuclear Kappa B</i>

NO	Óxido Nítrico, do inglês <i>Nitric Oxide</i>
PBS	Tampão fosfato-salino, do inglês <i>phosphate buffered saline</i>
RANK	Receptor de ativação do NF- $\kappa$ B
RANKL	Ligante do receptor de ativação do NF- $\kappa$ B
RNA	Ácido Ribonucleico, do inglês <i>Ribonucleic Acid</i> .
Rpm	Rotações por minuto
SFB	Soro Fetal Bovino
SPR	Superfície de <i>Plasmon</i> Ressonante, do inglês <i>Surface Plasmon Resonance</i>
TEM	Microscopia Eletrônica de Transmissão, do inglês <i>Transmission Electron Microscopy</i>
TLR	Receptor do tipo <i>toll</i>
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
TPA	12-0- tetradecanoylphorbol-13-acetate
UV-Vis	Espectroscopia no Ultravioleta-visível, do inglês <i>Ultraviolet-visible Spectroscopy</i> .
VN	Vermelho Neutro

## LISTA DE SÍMBOLOS

Au	Ouro
g	grama
°C	Grau Celsius
h	hora
nm	nanômetro
µL	microlitro
mg	miligrama
mL	mililitro
L	litro
h	hora
%	porcentagem
<	menor

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>18</b>
2.1. Etiologia da doença periodontal .....	18
2.2. Resposta imune do tecido periodontal ao biofilme .....	19
2.2.1. Receptores tipo-Toll .....	19
2.2.2. Linfócitos T .....	23
2.2.3. Linfócitos B .....	24
2.2.4. Melatoproteinases de Matriz e TIMPS .....	25
2.2.5. Interleucina-1 $\beta$ .....	26
2.2.6. TNF- $\alpha$ .....	26
2.2.7. Sistema RANK/RANKL/OPG .....	26
2.2.8. Óxido Nítrico .....	27
2.3. Modulação da resposta do hospedeiro na doença periodontal .....	28
2.4. Nanotecnologia .....	30
2.4.1. Nanotecnologia na Odontologia .....	32
2.4.2. Nanopartículas de ouro (AuNPs) .....	33
2.4.3. Mecanismo de ação das nanopartículas de ouro .....	35
2.5. Cultura de células como modelo <i>in vitro</i> para estudo da doença periodontal .....	40
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>43</b>
3.1. Objetivo geral .....	43
3.2. Objetivos específicos .....	43
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>44</b>
4.1. Síntese das nanopartículas de ouro .....	44
4.2. Caracterização das nanopartículas de ouro .....	46
4.2.1. Espectroscopia de absorção no ultravioleta-vísivel (UV-Visível) .....	46
4.2.2. Difractometria de Raios-X .....	46
4.2.3. Potencial Zeta .....	47
4.2.4. Espectrofotometria de absorção atômica .....	48
4.2.5. Microscopia eletrônica de varredura por canhão de emissão de campo elétrico (FEG) .....	48
4.3. Modelo <i>in vivo</i> .....	49
4.3.1. Animais .....	49
4.3.2. Aplicação tópica de formulações de AuNPs em modelo animal de edema de orelha .....	49



4.3.3. Aplicação tópica de formulações de AuNPs em modelo animal de edema de pata induzido por LPS.....	50
4.4. Modelo <i>in vitro</i> - Cultura de células .....	52
4.4.1. Cultivo de Fibroblastos 3T3 e Macrófagos RAW 264.7 .....	52
4.4.2 Avaliação do efeito das AuNPs na viabilidade celular de fibroblastos e macrófagos pelo ensaio de Thyazolyl Blue Tetrazoliumbromide (MTT) .....	53
4.4.3. Avaliação do efeito das AuNPs na viabilidade celular de fibroblastos e macrófagos pelo ensaio de Vermelho Neutro.....	54
4.4.4. Avaliação do efeito das AuNPs na viabilidade celular de macrófagos e fibroblastos pelo método de exclusão do azul de tripan .....	55
4.5. Análise Estatística.....	57
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>58</b>
5.1. Caracterização das Nanopartículas de ouro de 10, 20 e 30 nm: .....	58
5.2. Aplicação tópica de formulações de AuNPs em modelo animal de edema de orelha induzido por TPA.....	62
5.3. Aplicação tópica de formulações de AuNPs em modelo animal de edema de pata induzido por LPS.....	64
5.4. Viabilidade celular de fibroblastos e macrófagos .....	65
5.4.1. Viabilidade celular de fibroblastos 3T3 por MTT, Vermelho Neutro e Azul de Tripan.....	65
5.4.3. Viabilidade celular de macrófagos RAW 264.7 por MTT, Vermelho Neutro e Azul de Trypan.....	69
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>73</b>
<b>7. CONCLUSÃO .....</b>	<b>80</b>
<b>8. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>81</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A periodontite é uma doença infecciosa bacteriana com característica inflamatória crônica que pode se limitar à inflamação dos tecidos moles periodontais como a gengiva marginal livre, que quando não tratada pode progredir para a destruição das estruturas de suporte do dente, incluindo ligamento periodontal, osso alveolar e tecido gengival (Kinane e Bartold<sup>1</sup> 2007, Genco e Borgnakke<sup>2</sup> 2013, Carranza et al.<sup>3</sup> 2012).

Apesar de sua etiologia apresentar um perfil multifatorial, a presença do biofilme bacteriano na superfície dental é essencial. Porém sua progressão e severidade irá depender da presença de outros fatores de risco associados, bem como da relação entre os microrganismos e a resposta imune do hospedeiro (Kinane e Bartold<sup>1</sup> 2007).

A destruição tecidual e óssea característica da patogênese da doença periodontal é provocada pela própria reação inflamatória dos tecidos periodontais em resposta à presença prolongada do biofilme bacteriano (Caton e Ryan<sup>4</sup> 2011, Pihlstrom et al.<sup>5</sup> 2005). Sendo assim, o desenvolvimento de compostos e medicamentos que busquem minimizar a resposta inflamatória do hospedeiro são importantes no controle da progressão da doença e da consequente destruição tecidual.

A aplicação da nanotecnologia na área da saúde possibilitou o desenvolvimento de diferentes tecnologias moleculares e dispositivos que podem interagir com o corpo a nível celular, sub-celular ou molecular, podendo contribuir no diagnóstico e tratamento de diversas doenças (Zupancic et al.<sup>6</sup> 2015). O emprego de tecnologias na escala nanométrica permite a utilização de nanopartículas para diagnóstico, marcação e destruição de células cancerígenas e carreamento de biomoléculas para dentro das células (Sperling et al.<sup>7</sup> 2008).

Entre os compostos desenvolvidos pela nanotecnologia estão as nanopartículas de ouro (AuNPs). As AuNPs já apresentam diversas aplicações biológicas para diagnóstico e tratamento visando ações preventivas e terapêuticas na manutenção e recuperação do estado de saúde. A literatura indica suas propriedades

anti-inflamatórias e antioxidantes como justificativa da possibilidade do emprego dessas AuNPs no tratamento de doenças inflamatórias (Jeon et al.<sup>8</sup> 2003, Ma et al.<sup>9</sup> 2010, Sumbayev et al.<sup>10</sup> 2013). Porém, ainda não foram conduzidos estudos a respeito da aplicação de AuNPs especificamente no tratamento da doença periodontal. Assim, o presente estudo buscou caracterizar AuNPs de diversos diâmetros após seu processo de síntese e testá-las quanto a sua biocompatibilidade e potencial anti-inflamatório em modelos *in vivo* de inflamação aguda em camundongo e em modelos *in vitro* de cultura de células, a fim de aplicá-las posteriormente para estudos acerca do tratamento específico de condições inflamatórias bucais, como as doenças periodontais.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Etiologia da doença periodontal

A doença periodontal apresenta um perfil multifatorial, porém a presença do biofilme na junção dentogengival apresenta-se como fator desencadeador de sua patogênese. Sua progressão geralmente é lenta, porém a severidade e velocidade de progressão que a doença irá assumir dependerá da relação entre microrganismos e os mecanismos de defesas do hospedeiro (Kinane e Bartold<sup>1</sup> 2007), que podem assumir diferentes posturas em resposta ao tempo de duração da resposta inflamatória e à presença de outros fatores de risco modificadores associados. Entre esses fatores estão o tabagismo, diabetes mellitus, obesidade, osteoporose, estresse e fatores genéticos (Genco e Borgnakke<sup>2</sup> 2013).

Assim como outras doenças crônicas, devido à complexidade de sua etiopatogenia torna-se difícil precisar um único agente causal. Seria mais correto citar um conjunto de causas que desencadeiam a doença, conhecidos como causa suficiente. A primeira causa suficiente que foi estabelecida para a doença periodontal inclui: tabagismo, atraso na apoptose dos neutrófilos, produção de IL-1, presença de biofilme dentário, um dente e um defeito em um gene não especificado (Carranza et al.<sup>3</sup> 2012).

Apesar da presença do biofilme bacteriano na superfície dental ser a causa primária da doença, muitos estudos revelam que é a resposta imune do paciente a responsável pela destruição dos tecidos de suporte do dente (Caton e Ryan<sup>4</sup> 2011). Dentre os fatores que podem modificar o risco ao desenvolvimento da periodontite estão o diabetes, gravidez e tabagismo. Tais fatores podem ter efeitos sobre a resposta fisiológica do organismo, o sistema vascular, a resposta inflamatória, o sistema imune e o processo de reparo tecidual. Isso demonstra o potencial dessas condições na determinação da susceptibilidade à doença, da microbiota do biofilme, na apresentação clínica e progressão da doença periodontal e na resposta ao tratamento (Lindhe et al.<sup>11</sup> 2010).

Doenças e condições sistêmicas que podem alterar o mecanismo de defesa do hospedeiro diante de uma resposta imune no tecido periodontal podem modificar o risco do indivíduo de desenvolver a doença periodontal. Pacientes que apresentam condições sistêmicas debilitantes e concomitantemente hábitos ineficientes de higiene bucal e remoção de biofilme são mais propensos à destruição periodontal grave e extensa. Tal relação sinérgica dificulta o tratamento clínico efetivo do paciente com técnicas convencionais sem que haja o controle prévio da condição sistêmica (Carranza et al.<sup>3</sup> 2012).

## 2.2. Resposta imune do tecido periodontal ao biofilme

### 2.2.1. Receptores tipo-Toll

Na doença periodontal o sistema imune é ativado por diversas vias. A resposta imune inata é a primeira linha de defesa do hospedeiro contra infecção. Ela se desenvolve através de receptores tipo-toll (TLRs, do inglês *Toll-like Receptor*). Os TLRs são receptores capazes de reconhecer padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), que constituem padrões estruturais que são compartilhados por diferentes grupos de espécies bacterianas, inclusive periodontopatógenos. Os TLRs são expressos principalmente em neutrófilos, macrófagos, células dendríticas e linfócitos, sendo que particularmente na estrutura periodontal eles estão presentes em células do epitélio gengival, fibroblastos gengivais, células endoteliais, osteoblastos, osteoclastos, cementoblastos e fibroblastos do ligamento periodontal a fim de desempenhar diferentes funções (quadro 1) (Hans e Hans<sup>12</sup> 2011). Até o momento, onze diferentes tipos de TLRs já foram identificados em mamíferos (Akira e Takeda<sup>13</sup> 2004), sendo cada um estimulado por ligantes específicos.

**Quadro 1.** Expressão de TLRs nos tecidos periodontais

(continua)

<b>Célula Periodontal</b>	<b>Receptor tipo-toll</b>	<b>Função</b>
Células epiteliais gengivais	TLR 2, 3, 4, 5, 6, 9	Aumento na atração e migração de leucócitos contra os antígenos para o lúmen da bolsa periodontal, além de induzir a produção de interleutina-8 (IL-8) e metaloproteinases de matriz (MMPs)

**Quadro 1.** Expressão de TLRs nos tecidos periodontais

(conclusão)

<b>Célula Periodontal</b>	<b>Receptor tipo-toll</b>	<b>Função</b>
Fibroblastos gengivais	TLR 2, 4, 9	Aumenta a produção de diversas citocinas pró-inflamatórias
Células endoteliais	TLR 1, 3, 4, 5	Produção de citocinas e quimiocinas e migração de células do sistema imune através do sulco gengival.
Osteoblastos	TLR 1, 4, 5, 6, 9	Eleva a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-8, fator de necrose tumoral $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) e mediadores biológicos responsáveis pela reabsorção óssea. Aumento da expressão de ligante do receptor de ativação do fator nuclear kappa B (RANKL)
Osteoclastos	TLR 2, 4	Elevação da sobrevivência de osteoblastos e eleva as atividades osteoclásticas.
Cementoblastos	TLR 2, 4	Diminui a expressão de RANKL
Fibroblastos do ligamento periodontal	TLR 2, 4	Aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias, liberação de proteases causando destruição direta dos tecidos adjacentes

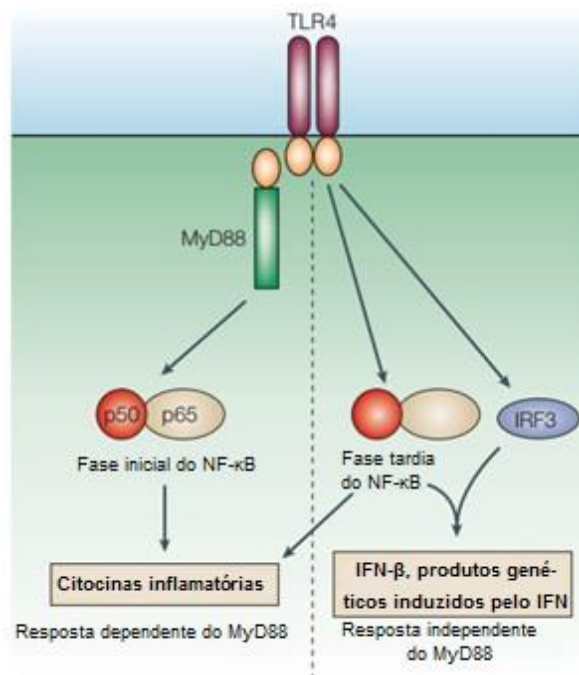
**Fonte:** Adaptado de Hans e Hans<sup>12</sup> (2011).

Os TLRs, juntamente com os receptores de interleucina-1 (IL-1Rs) constituem uma superfamília de receptores. Eles apresentam em comum seu domínio citoplasmático TIR (Toll-IL-1 receptor), porém seus domínios extracelulares diferem, onde os TLRs apresentam um motivo de repetição rico em leucina e os IL-1Rs contêm três domínios do tipo imunoglobulina (Akira e Takeda<sup>13</sup> 2004).

O periodonto é um ambiente único no corpo, pois os microrganismos orais estão sempre presentes ativando de forma constante o sistema imune do hospedeiro. Os TLRs presentes nas células epiteliais gengivais são constantemente estimulados, tendo um papel importante na manutenção da saúde bucal através da produção de  $\beta$ -defensinas e IL-8 para o recrutamento de neutrófilos. Quando a barreira epitelial é rompida ocorre uma invasão bacteriana no tecido conjuntivo adjacente, levando a ativação dos TLRs presentes em outras células residentes e não residentes do periodonto. Porém, uma liberação exagerada de citocinas pró-inflamatórias e outros mediadores biológicos realizando uma estimulação crônica dos TLRs pode levar a destruição tecidual (Hans e Hans<sup>12</sup> 2011).

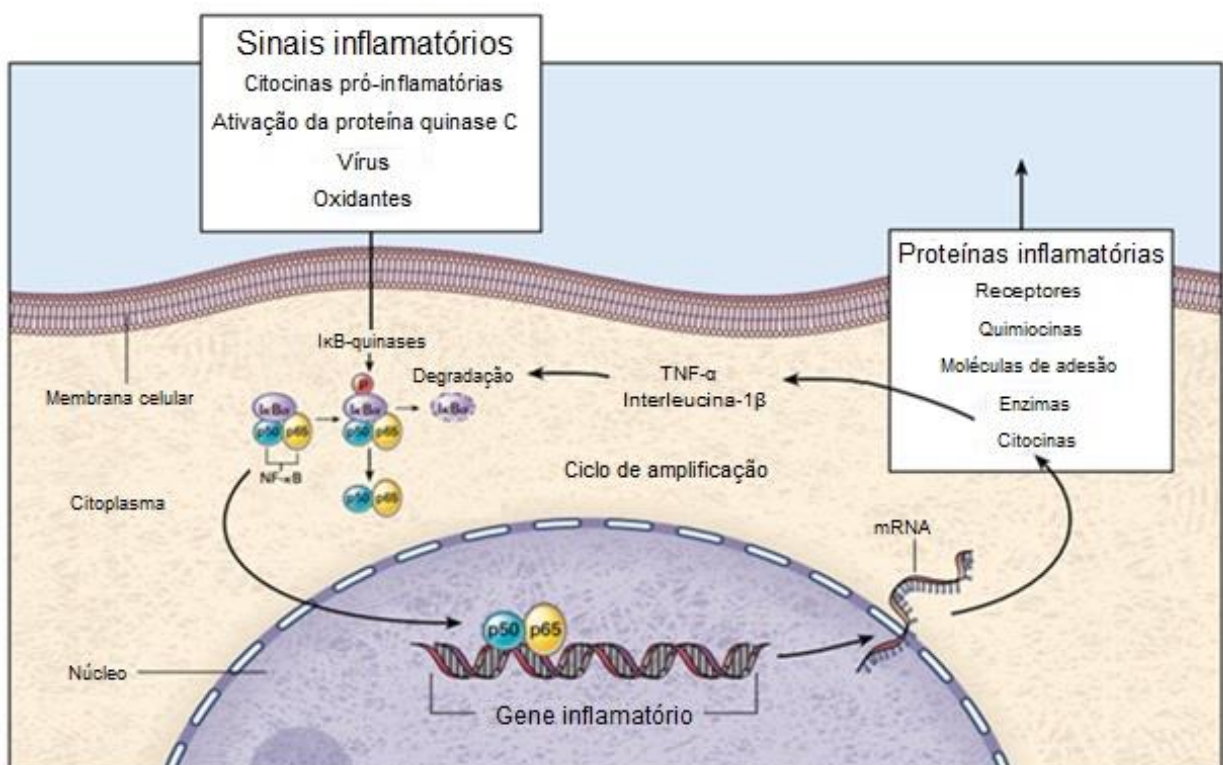
Os TLRs interagem com os PAMPs através de seu domínio extracelular C-terminal rico em leucinas repetidas. Após a interação com seu ligante específico ocorre o recrutamento intracelular de moléculas adaptadoras com domínio N-terminal TIR, como o MyD88, TIRAP, TRIF e TRAM. Em seguida serão recrutadas proteínas da família IRAK e TRAF para o complexo receptor gerando a ativação de diferentes enzimas, culminando na ativação dos fatores de transcrição IRF3, IRF5 e IRF7, NF- $\kappa$ B e AP-1, que constituem mecanismos essenciais para a indução da resposta imune inata e adaptativa (Akira e Takeda<sup>13</sup> 2004, Ferreira<sup>14</sup> 2012).

Dentre os PAMPs reconhecidos por TLRs, está uma das moléculas mais importantes na patogênese da doença periodontal, o lipopolissacarídeo (LPS). Ele está presente na membrana celular de diferentes espécies bacterianas gram-negativas. O LPS é reconhecido como ligante do receptor tipo Toll 4 (TLR-4), levando a ativação final do NF- $\kappa$ B por duas diferentes vias de sinalização (Figura 1). Uma via funciona de maneira dependente de uma molécula adaptadora, o fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88), e a outra via de maneira independente de MyD88, porém necessitando de outras duas moléculas adaptadoras como o adaptador contendo domínio TIR indutor de interferon  $\beta$  (TRIF) e TRAM (Ma et al.<sup>9</sup> 2010, Akira e Takeda<sup>13</sup> 2004, Ferreira<sup>14</sup> 2012).



**Figura 1.** Sinalização do TLR-4: Via independente e via dependente de MyD-88. Adaptado de Akira e Takeda<sup>13</sup> (2004).

O NF- $\kappa$ B é um fator de transcrição importante não apenas na inflamação, mas para diversos mecanismos como ativação de linfócitos e sobrevivência celular. Ele pode ser ativado por citocinas, por reconhecimento de antígenos e por estimulação via TLR (como ocorre com o LPS bacteriano). O NF- $\kappa$ B encontra-se em sua forma citoplasmática em complexo com outras proteínas que representam subunidades inibitórias do  $\kappa$ B (I $\kappa$ Bs), as quais desempenham um papel importante no controle da atividade do NF- $\kappa$ B. Após a célula ser estimulada pela ligação de citocinas ou reconhecimento de antígenos ocorre o direcionamento da I $\kappa$ B- $\alpha$  para degradação por enzimas I $\kappa$ B-quinases num processo de fosforilação, ubiquitinação e degradação proteossômica. Esse processo expõe a sequência sinal de localização nuclear do NF- $\kappa$ B permitindo a migração desse fator para o núcleo induzindo a expressão de genes determinados, desencadeando a transcrição de RNAm para produção de diferentes mediadores inflamatórios pela célula (Abbas et al.<sup>15</sup> 2012, Baeuerle e Henkel<sup>16</sup> 1994).



**Figura 2.** Representação do papel do NF- $\kappa$ B como um regulador inflamatório. Adaptado de Barnes e Karin<sup>17</sup> (1997).



### 2.2.2. Linfócitos T

Na mobilização de mecanismos da resposta imune adaptativa na doença periodontal, patógenos ativam células apresentadores de antígenos, como as células dendríticas. Após sua ativação, as células dendríticas maduras expressam moléculas co-estimulatórias e produzem diferentes padrões de citocinas que irão determinar a subsequente polarização de linfócitos antígeno-específicos, estimulando a migração seletiva de subtipos de linfócitos T auxiliares CD4<sup>+</sup>. Entre os seus subtipos estão as células Th1, Th2, Th17 e Tregs (linfócitos T reguladores). Geralmente, respostas imunológicas mediadas por células Th1 são caracteristicamente celulares e pró-inflamatórias, enquanto respostas mediada por células Th2 estão associadas com a imunidade humoral e propriedades anti-inflamatórias (Garlet et al.<sup>18</sup> 2010).

O INF- $\gamma$  é uma citocina característica de respostas com perfil Th1, sendo considerada a principal citocina de ativação de fagócitos (Garlet et al.<sup>18</sup> 2010). A expressão de IFN- $\gamma$  resulta do aumento dos níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (e consequente aumento de RANKL), além de estimular a formação de osteoclastos e ser responsável pela quimiotaxia de células RANKL<sup>+</sup> (Gao et al.<sup>19</sup> 2007, Garlet et al.<sup>20</sup> 2008). Ela está associada a formas progressivas e de maior severidade de periodontite (Dutzan et al.<sup>21</sup> 2009, Garlet et al.<sup>22</sup> 2003).

Os linfócitos Th17 são um subtipo de células T CD4<sup>+</sup>, estando envolvidos em diferentes condições inflamatórias e autoimunes (Dong<sup>23</sup> 2008). Células Th17 participam de mecanismos de destruição óssea através da produção de IL-17, que age como indutor da produção de RANKL (Sato et al.<sup>24</sup> 2006). A habilidade de células Th17 de produzir IL-6 e regular uma maior produção de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  pode gerar uma amplificação da inflamação com consequente aumento da expressão de metaloproteinases de matriz (MMPs) e RANKL (Beklen et al.<sup>25</sup> 2007) além de estarem presentes em lesões periodontais (Garlet et al.<sup>18</sup> 2010, Ohyama et al.<sup>26</sup> 2009).

Os linfócitos T reguladores (Tregs) são importantes no controle da resposta inflamatória, sendo descrita sua função no equilíbrio da resposta pró-inflamatória, predispondo o ambiente à regeneração tecidual e óssea periodontal, possivelmente através da expressão de IL-10 e osteoclastina (Garlet et al.<sup>18</sup> 2010). Estudo em

camundongos e cães demonstra que a utilização de CCL22 para o recrutamento de linfócitos Tregs para o sítio de instalação da doença periodontal reduz os parâmetros de inflamação e perda óssea alveolar (Glowacki et al.<sup>27</sup> 2013).

Apesar dessa divisão de funções das células T, marcadores característicos de todos os subconjuntos (Th1, Th2, Th17 e Treg) têm sido descritos na doença periodontal, sendo que bactérias patogênicas bucais são capazes de desencadear a ativação e produção de mediadores característicos de resposta polarizadas por qualquer subtipo de células T (Garlet et al.<sup>18</sup> 2010).

### **2.2.3. Linfócitos B**

Linfócitos B participam da resposta imune adaptativa, reconhecendo antígenos e, a partir de estímulo apropriado, se diferenciam em células secretoras de anticorpos antígeno-específico. Porém seu papel na resposta imune inata ganhou destaque a partir da descoberta dos TLRs, e de que células B também apresentavam esses receptores, e que certos subtipos apresentam maior sensibilidade a sua ativação (Booth et al.<sup>28</sup> 2011).

Células B ativadas podem também atuar como células apresentadoras de antígenos para células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. No entanto, diferentemente das células dendríticas, as células B podem apresentar o antígeno de maneira seletiva através de moléculas de imunoglobulina em sua superfície, permitindo assim a apresentação de antígeno mesmo em baixas concentrações. Além disso, as células B podem efetuar a apresentação de antígeno a outras células de maneira indireta, através da produção de anticorpos específicos (Gonzales<sup>29</sup> 2015, Kurt-Jones et al.<sup>30</sup> 1988).

Sugere-se que as células B em pacientes com susceptibilidade à periodontite apresentem uma maior propensão a propriedades auto-reativas em relação aos pacientes com baixa susceptibilidade à doença periodontal (Berglundh et al.<sup>31</sup> 2002). Em estudo clínico realizado por Donati et al.<sup>32</sup> (2009) foram realizadas biópsias gengivais em bolsas com mais de 6 mm de profundidade que apresentavam sangramento, e verificou-se que as células B se apresentam em maior proporção do

que células T no plasma, além de 65% dessas células apresentarem características de auto-reatividade.

#### **2.2.4. Metaloproteinases de Matriz e TIMPS**

As Metaloproteinases da Matriz (MMPs) constituem um grupo de enzimas (endopeptidases) responsáveis pela degradação dos componentes da matriz extracelular (MEC) e das membranas basais, desempenhando papel importante da degradação e remodelação de proteínas de matriz durante diferentes processos fisiológicos e patológicos. As MMPs são produzidas principalmente por leucócitos polimorfonucleares, queratinócitos, monócitos, macrófagos, fibroblastos e células mesenquimais em resposta a fatores de crescimento e citocinas como a Interleucina 1 (IL-1), o TNF- $\alpha$  e o TGF- $\alpha$  (fator de crescimento transformante alfa). Na presença desses fatores de crescimento e citocinas, essas células liberam as MMPs de grânulos específicos de armazenamento para o meio extracelular (Birkedal-Hansen<sup>33</sup> 1993, Garlet et al.<sup>34</sup> 2004). Birkedal-Hansen<sup>33</sup> (1993) propõe quatro vias de regulação da atividade das MMPs no substrato da matriz extracelular: por regulação na transcrição nos genes das MMPs, por ativação de precursores, por diferenças de especificidade de substrato, e por inibidores de MMPs.

Uma das formas de regulação da ativação de MMPs é realizada por um grupo de proteínas endógenas chamadas inibidores de metaloproteinases teciduais (TIMPs), sendo capazes de inibir quase todos os membros da família das MMPs de maneira não-específica (Baker et al.<sup>35</sup> 2002).

As MMPs e TIMPs são regularmente expressas no tecido periodontal saudável, podendo controlar o *turnover* fisiológico da matriz extracelular (Goncalves et al.<sup>36</sup> 2008). No entanto, um desequilíbrio nessa relação está presente em tecidos periodontais doentes, podendo ser responsável pela destruição tecidual na doença periodontal (Garlet et al.<sup>34</sup> 2004, Goncalves et al.<sup>36</sup> 2008).

### **2.2.5. Interleucina-1 $\beta$**

A Interleucina 1- $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) é uma citocina inflamatória clássica do sistema imune inato, estando associada com a migração de células inflamatórias e com a osteoclastogênese (Graves et al.<sup>37</sup> 2008). Porém, ela também desempenha um papel crucial mediando a ligação entre a imunidade inata e adaptativa. Ela atua através do receptor de membrana tipo 1 associado a IL-1, induzindo a ativação de células apresentadoras de antígeno (Loiarro et al.<sup>38</sup> 2010) e ativando o NF- $\kappa$ B, levando à produção de TNF- $\alpha$  (Sumbayev e Yasinska<sup>39</sup> 2006).

### **2.2.6. TNF- $\alpha$**

O TNF- $\alpha$  é uma citocina chave na patogênese de doenças inflamatórias em geral, pois é uma citocina caracteristicamente envolvida na amplificação de respostas inflamatórias (Garlet et al.<sup>18</sup> 2010) estimulando a produção de outras citocinas clássicas do sistema imune inato como a IL-1 $\beta$  e IL-6 (Dinarello<sup>40</sup> 2000, Kwan Tat et al.<sup>41</sup> 2004).

A presença dessa citocina no soro e nos tecidos está relacionada com a atividade da doença inflamatória e com o grau de dano tecidual (Mayer et al.<sup>42</sup> 2013), visto que o TNF- $\alpha$  age promovendo a secreção de moléculas responsáveis pela degradação de matriz extracelular e reabsorção óssea (Garlet et al.<sup>34</sup> 2004, Graves et al.<sup>37</sup> 2008). Essa citocina participa da resposta inflamatória periodontal por atuar no processo de migração celular, sendo responsável pelo recrutamento de neutrófilos e macrófagos para o local lesionado, além de estar relacionada com a expressão de MMPs e RANKL, que são moléculas envolvidas no processo de degradação do tecido conjuntivo e ósseo característico da doença periodontal (Garlet et al.<sup>18</sup> 2010, Van Dyke e van Winkelhoff<sup>43</sup> 2013).

### **2.2.7. Sistema RANK/RANKL/OPG**

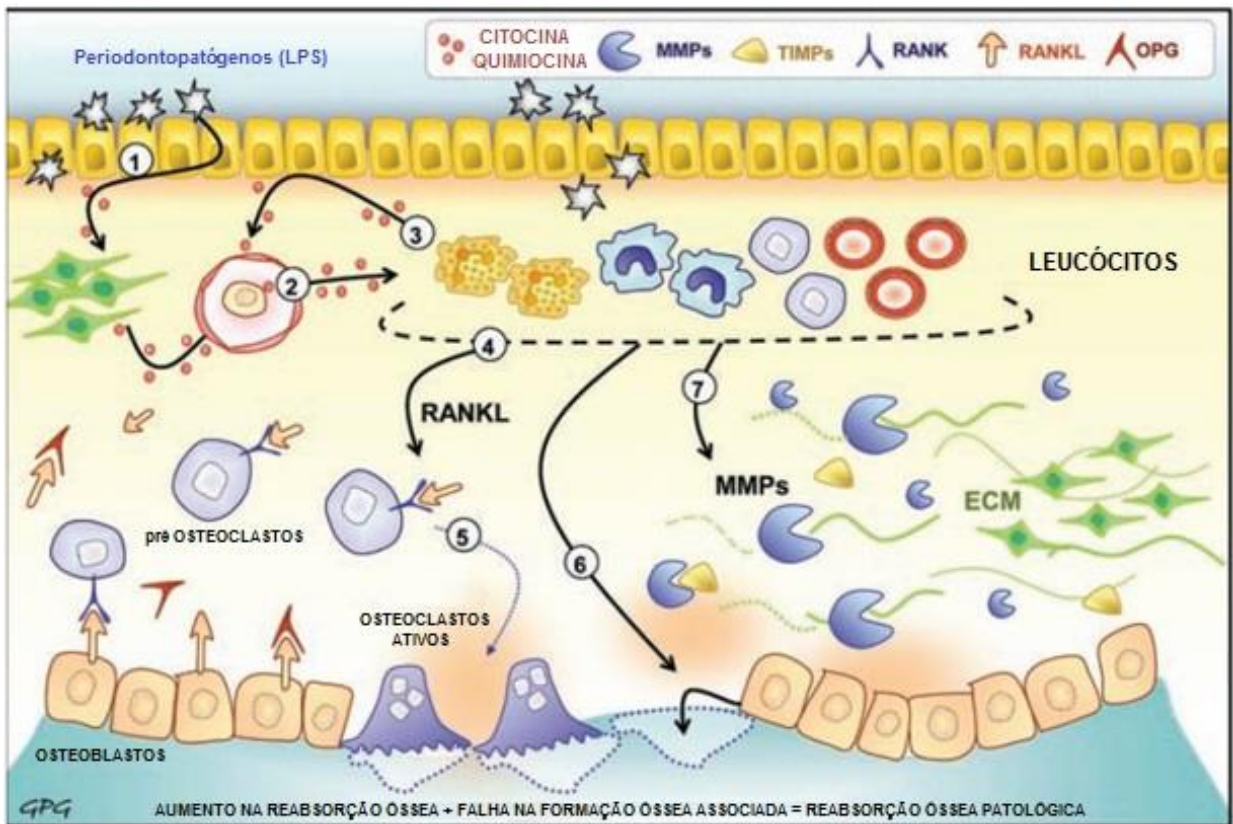
A perda óssea alveolar é um evento chave na doença periodontal. A integridade dos tecidos depende do delicado equilíbrio entre reabsorção óssea pelos osteoclastos e formação óssea pelos osteoblastos. O principal mecanismo regulatório da atividade osteoclástica é dada pelo receptor RANK (receptor de ativação do NF- $\kappa$ B), e seu ligante (RANKL) e seu homólogo solúvel osteoprotegerina (OPG). RANKL se liga ao receptor RANK presente na superfície de pré-osteoclastos, levando a sua maturação e ativação, enquanto a OPG atua como um receptor e inibe a interação RANK-RANKL (Leibbrandt e Penninger<sup>44</sup> 2008). O equilíbrio entre a expressão de RANKL e OPG é essencial para a determinação de atividade osteolítica em condições fisiológicas (Garlet<sup>45</sup> 2010). Porém, estudos demonstram um aumento da expressão de RANKL em tecidos com doença periodontal (Garlet et al.<sup>34</sup> 2004, Bostanci et al.<sup>46</sup> 2007, Nagasawa et al.<sup>47</sup> 2007).

#### **2.2.8. Óxido Nítrico**

O óxido nítrico (NO) também apresenta papel importante na doença periodontal, assim como outras doenças inflamatórias. O óxido nítrico participa do mecanismo de vasodilatação, estimulação de citocinas, regulação da função de tecidos mineralizados, neurotransmissão e agregação plaquetária, porém também está relacionado com características fisiopatológicas de doenças inflamatórias como a doença periodontal (Ugar-Cankal e Ozmeric<sup>48</sup> 2006). Estímulos inflamatórios podem induzir uma maior síntese de NO pelas células inflamatórias através do aumento da expressão da enzima iNOS e assim interferir na progressão da doença periodontal (Kendall et al.<sup>49</sup> 2001, Matejka et al.<sup>50</sup> 1998).

O NO é sintetizado de maneira endógena na presença de O<sub>2</sub> pela óxido nítrico sintase (NOS) através da conversão da L-arginine a NO e L-citrulline. São identificadas 3 isoformas da NOS no organismo: NOS neuronal (nNOS), NOS endotelial (eNOS) e NOS induzida (iNOS). Entre essas três isoformas, apenas a iNOS é altamente expressa em macrófagos ativado por LPS e/ou citocinas. Na doença periodontal o NO é provavelmente produzido pela ação da iNOS e age diretamente na manutenção da inflamação. O NO derivado da iNOS desempenha um papel crucial em macrófagos em condições fisiológicas, porém a produção em excesso de NO em

respostas inflamatórias pode levar a choque séptico e danos teciduais (Ma et al.<sup>9</sup> 2010).



**Figura 3.** Mecanismos celulares e moleculares da resposta imune do hospedeiro responsáveis pela progressão da doença periodontal. Adaptado de Garlet<sup>45</sup> (2010).

### 2.3. Modulação da resposta do hospedeiro na doença periodontal

Apesar da raspagem e alisamento radicular ser o tratamento convencional e mais indicado para a doença periodontal, ele pode ser combinado com o uso de agentes locais e sistêmicos de ação anti-inflamatória e antimicrobiana. A utilização de medicamentos como terapia complementar à raspagem e alisamento radicular é uma opção em casos de pacientes que não correspondem ao tratamento convencional isolado (Carranza et al.<sup>3</sup> 2012).

Atualmente, admite-se o uso de medicamentos a fim de modulação da resposta inflamatória, conhecidos como Moduladores da Resposta do Hospedeiro (MRH). Entre eles está a doxiciclina, uma tetraciclina utilizada em doses

subantimicrobianas (20 mg/2x ao dia durante ao menos 3 meses) e o único medicamento reconhecido pela FDA (Food and Drug Administration) para inibição de MMPs utilizado para o tratamento da doença periodontal, desde que aliado ao procedimento de raspagem e alisamento radicular (Caton e Ryan<sup>4</sup> 2011).

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) também vêm sendo estudados e utilizados para o controle da doença periodontal, visto que atuam limitando a produção de prostaglandinas e demais metabólitos da cascata metabólica do ácido araquidônico a partir do bloqueio da via da ciclooxigenase (Heasman et al.<sup>51</sup> 1993). Diversos AINEs foram testados em estudos clínicos administrados tópicos e sistemicamente para o tratamento de gengivite, e periodontite crônica e agressiva (Oringer<sup>52</sup> 2002), apresentando efeitos na diminuição da inflamação e da reabsorção óssea, como o flurbiprofen (Heasman et al.<sup>51</sup> 1993). Estudos pré-clínicos apontam que a utilização de inibidores seletivos para COX-2, como celecoxibe e etoricoxibe preveniu a perda óssea alveolar induzida por ligadura em modelos experimentais de periodontite em ratos (Azoubel et al.<sup>53</sup> 2007, Holzhausen et al.<sup>54</sup> 2002, Holzhausen et al.<sup>55</sup> 2005). Porém os efeitos colaterais, principalmente relacionados a lesão do trato gastrointestinal e problemas cardiovasculares, provocados pelo uso dos AINEs a longo prazo apresenta uma séria limitação de seu uso e indicação de maneira rotineira como adjunto na terapia periodontal (de Almeida<sup>56</sup> 2004).

A utilização de medicamentos que agem inibindo a ativação do NF- $\kappa$ B tem sido investigada para o tratamento de doenças caracterizadas pelo aumento da atividade osteoclástica, como o mieloma múltiplo, tendo alcançado resultados positivos. Porém, até o momento os dados ainda são insuficientes para suportar seu uso para o tratamento da periodontite. A administração local de terapias anti-NF- $\kappa$ B pode ser terapêutica e clinicamente útil no tratamento da doença periodontal, porém ainda são necessários ensaios clínicos que suportem o seu uso (Gokhale e Padhye<sup>57</sup> 2013).

Estudos também abordam a modulação da resposta do hospedeiro atenuando o efeito de moléculas como MMPs e prostanóides, e também estimulando a ação de mediadores lipídicos como lipoxinas e resolvinas, que parecem resolver a resposta inflamatória crônica em vez de apenas suprimí-las (Dentino et al.<sup>58</sup> 2013).

A modulação da resposta do hospedeiro na doença periodontal também pode ser realizada com o uso de terapias baseadas em citocinas (Gokhale e Padhye<sup>57</sup> 2013). A partir desse princípio surgiu a terapia anti TNF- $\alpha$  com anticorpos monoclonais. Esse modelo de terapia é utilizado no tratamento de doenças autoimune com etiologia inflamatória (Lebwohl<sup>59</sup> 2003). Estudos clínicos e experimentais mostram uma melhora clínica da periodontite com a inibição da atividade do TNF- $\alpha$  (Mayer et al.<sup>60</sup> 2009, Romano et al.<sup>61</sup> 2015). Estudo de Garlet e colaboradores em 2006 indicou que camundongos deficientes de receptores para TNF- $\alpha$  (p55-TNF- $\alpha$ ) tiveram menos periodontite severa em resposta à infecção pelo *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (AA) demonstrada por menor perda óssea alveolar. Porém, a “ausência” desses receptores resultou em uma diminuição da imunidade protetora contra infecção por AA, levando ao aumento da carga bacteriana e níveis mais elevados de proteína C-reativa. Foi demonstrado assim que o TNF- $\alpha$  apresenta não apenas um papel determinante da gravidade da doença periodontal, mas também tem função imune protetora contra infecção periodontal (Garlet et al.<sup>62</sup> 2007). Apesar dos benefícios dos antagonistas TNF- $\alpha$  no controle da doença periodontal, os efeitos adversos da terapia fazem com que a sua utilização em pacientes com periodontite não seja recomendada (Mayer et al.<sup>42</sup> 2013).

Para o tratamento efetivo da doença periodontal ainda são necessários estudos a fim de desenvolver métodos complementares que consigam reduzir a carga bacteriana, modificar fatores de risco e a resposta do hospedeiro levando a melhores desfechos clínicos quando comparados ao tratamento periodontal isolado (Gokhale e Padhye<sup>57</sup> 2013).

## **2.4. Nanotecnologia**

Nanotecnologia é a manipulação e utilização de materiais, dispositivos e sistemas a partir do controle da matéria na escala de comprimento nanométrica (em dimensões de cerca de 1-100 nm), ou seja, no nível de átomos, moléculas e estruturas supramoleculares. Ela engloba ciência em nanoescala, engenharia e tecnologia, envolvendo imagem, medição, modelagem e manipulação de matéria nessa escala de comprimento (Jain<sup>63</sup> 2008).



A nanobiotecnologia surgiu da investigação sobre os biosistemas em nanoescala criando uma das ciências e tecnologia mais dinâmicas baseada na confluência das ciências físicas, engenharia molecular, biologia, biotecnologia e medicina (Roco<sup>64</sup> 2003). Inúmeras aplicações na indústria farmacêutica, como a descoberta de medicamentos e entrega de drogas podem ser denominados "produtos nanobiofarmacêuticos" (Jain<sup>63</sup> 2008).

Já a nanomedicina é a aplicação da nano e biotecnologia à medicina, e representa um dos campos multidisciplinares mais importantes que se desenvolveu no final do século XX (Sahoo et al.<sup>65</sup> 2007). A nanomedicina se fundamenta na utilização de tecnologias moleculares para diferentes aplicações. Tais aplicações como: a criação de dispositivos estruturados em nanoescala que atuem como avançados biossensores de diagnóstico e para entrega de drogas específicas; atuação na medicina molecular via genômica, proteômica e microrganismos modificados artificialmente; e criação de sistemas moleculares destinados à destruição da causa da patologia e à substituição de cromossomos em "cirurgia" a nível celular *in vivo* (Freitas<sup>66</sup> 2002).

A síntese de compostos de forma nanoparticulada é um dos objetivos da nanotecnologia. Essas nanopartículas podem se apresentar na forma orgânica e inorgânica (Maciel et al.<sup>67</sup> 2003). Vírus e componentes celulares são exemplos de nanopartículas orgânicas, enquanto as nanopartículas baseadas em óxidos metálicos e metais (como o cobre, níquel, ouro e prata) compõe o grupo das nanopartículas inorgânicas (Sperling et al.<sup>7</sup> 2008).

O tamanho, a composição, a forma e a natureza da superfície das nanopartículas são alguns dos fatores responsáveis pelas propriedades químicas e físicas que as nanopartículas podem apresentar (Huang et al.<sup>68</sup> 2006, Bhattacharya e Mukherjee<sup>69</sup> 2008). Assim, as nanopartículas são comumente incorporadas a diferentes materiais a fim de melhorar suas propriedades (Mann<sup>70</sup> 2006), podendo apresentar ação antimicrobiana, anti-inflamatória e antifúngica como já apresentado na literatura (Weir et al.<sup>71</sup> 2008).

O fato da dimensão das nanopartículas localizar-se no intervalo nanométrico torna seu tamanho semelhantes ao de muitas biomoléculas, o que permite que elas entrem e atravesem facilmente os tecidos, células e organelas (Fischer e Chan<sup>72</sup> 2007,

Oberdorster et al.<sup>73</sup> 2005). Tal fato permite a utilização das nanopartículas como veículo carreador de biomoléculas para locais onde geralmente medicamentos comuns teriam dificuldade de alcançar.

Além disso, as nanopartículas apresentam uma porcentagem consideravelmente alta de átomos em sua superfície em relação a outras partículas, o que eleva sua proporção entre área de superfície e volume, aumentando sua reatividade e contribuindo para que elas apresentem propriedades diferenciadas. Essa característica é alvo de interesse, pois pode levar ao aumento da atividade biológica das nanopartículas, sendo útil para a penetração nas células e entregar fármacos (Siddiqi et al.<sup>74</sup> 2012). Porém essa mesma característica implica em maior toxicidade (Chen et al.<sup>75</sup> 2006).

Devido a facilidade de nanopartículas penetrarem tecidos e células, elas podem acumular-se no interior das células e provocar efeitos tóxicos a nível celular ou a nível de organismo (Oberdorster et al.<sup>73</sup> 2005, Armstrong et al.<sup>76</sup> 2004). Muitas são capazes de alcançar até mesmo o núcleo celular, podendo induzir disfunção mitocondrial e formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) o que pode causar dano ao DNA (Auffan et al.<sup>77</sup> 2009).

#### **2.4.1. Nanotecnologia na Odontologia**

Na Odontologia, o uso de nanopartículas em materiais dentários pode ser benéfico devido a suas propriedades físicas e químicas diferenciadas decorrentes de seu tamanho (Osorio et al.<sup>78</sup> 2014). Além disso, drogas chamadas nanofarmacêuticas baseadas em nanomateriais têm sido extensivamente utilizadas nos últimos anos buscando a cura e o tratamento de problemas bucais, como a periodontite. Até agora existem diversas pesquisas que investigam o uso de sistemas carreadores para entrega de drogas específicas na bolsa periodontal. Entre os sistemas explorados estão nanocompósito de hidrogel, nanopartículas e nanoemulsões. Até o momento, vários compostos já foram encapsulados em sistemas de nanocarreamento para tratar periodontite, como plantas e drogas sintéticas como triclosan, tetraciclina, extrato de *Harungana madagascariensis*, minociclina, metronidazol e clorexidina. Num futuro próximo a nanotecnologia poderá ser empregada para o diagnóstico e tratamento de

câncer bucal, cura da hipersensibilidade e anestesia de pacientes (Narang e Narang<sup>79</sup> 2015).

Estudo demonstra que nanopartículas de ouro são atrativas para a utilização em materiais dentários, devido a sua habilidade de inibir MMP-8 e MMP-9 mesmo em baixas concentrações, sem induzir toxicidade ou inflamação celular (Hashimoto et al.<sup>80</sup> 2015). Essa característica é importante para as pesquisas com materiais odontológicos pois a presença de MMPs na interface adesiva de restaurações provoca a hidrólise de fribriñas de colágeno sendo a principal causa da degradação de materiais adesivos (Hashimoto et al.<sup>80</sup> 2015, Osorio et al.<sup>81</sup> 2011). Além disso, a presença de MMPs nos tecidos em desequilíbrio com seu inibidor, as TIMPs, ocorre em diversos processo patológicos que envolvem destruição tecidual, como a doença periodontal (Birkedal-Hansen<sup>33</sup> 1993).

#### **2.4.2. Nanopartículas de ouro (AuNPs)**

O ouro apresenta um vasto histórico de uso medicinal. Usado pelos chineses desde 2500 a.c. (Norton<sup>82</sup> 2008, Juzenas et al.<sup>83</sup> 2008), existem relatos do seu uso para tratamento de epilepsia, sífilis e doenças reumáticas, além de efeito rejuvenescedor (Bhattacharya e Mukherjee<sup>69</sup> 2008).

Apesar do ouro ser geralmente considerado química e biologicamente inerte (Hammer e Norskov<sup>84</sup> 1995), a possibilidade de que sua forma coloidal em nanopartículas possa apresentar, além do potencial efeito funcional, um efeito tóxico nas células ainda é uma preocupação (Sperling et al.<sup>7</sup> 2008, Brooking et al.<sup>85</sup> 2001). Pois mesmo substâncias consideradas biologicamente inertes poderiam tornar-se tóxicas em um estado nanoparticulado devido a sua maior reatividade e, possivelmente, sua maior facilidade de penetração nas células e de atravessar as membranas biológicas (Oberdorster et al.<sup>73</sup> 2005, Reeves et al.<sup>86</sup> 2008).

O número de pesquisas sobre o ouro na forma nanoparticulada tem crescido significativamente devido à possibilidade de diversas aplicações biológicas, além de estudos apresentarem como vantagens sua biocompatibilidade (Yamada et al.<sup>87</sup> 2015), uma síntese relativamente simples, a facilidade do controle do tamanho das nanopartículas, a facilidade de modificação química de sua superfície, e a facilidade

de caracterização devido à presença de uma banda de superfície de *plasmon* ressonante (SRP) (Yamada et al.<sup>87</sup> 2015, Jain et al.<sup>88</sup> 2007). Esse fenômeno consiste na oscilação coletiva de elétrons livres na nanopartícula metálica, criando uma densidade de carga em sua superfície e provocando uma acentuada absorção de luz na região visível do espectro no caso dos metais nobres como o ouro, fazendo com que líquidos contendo nanopartículas deste material apresentem coloração característica (Pereira<sup>89</sup> 2009).

As possíveis aplicações biológicas das nanopartículas de ouro podem ser classificadas em quatro aspectos: marcação, entrega, aquecimento e detecção. As AuNPs podem ser utilizadas para marcação de regiões e células de interesse para auxílio no diagnóstico, sendo dirigidas para a região de interesse proporcionando contraste para a observação e visualização desta região, baseada na fotoexcitação das nanopartículas. Elas também são aplicáveis na entrega de medicamentos, sendo utilizadas como veículo para o carregamento de biomoléculas para dentro das células, sendo que as células naturalmente ingerem partículas coloidais. Outra aplicação das AuNPs é para o aquecimento, fenômeno chamado de hipertermia utilizado em terapias anti-câncer, pois células são sensíveis a pequenos aumentos de temperatura. Quando as partículas de ouro absorvem a luz, os elétrons livres presentes são excitados, e a excitação dos *plasmons* da superfície provoca a oscilação coletiva dos elétrons livres. Após a interação entre os elétrons e a rede cristalina das partículas de ouro, os elétrons relaxam e a energia térmica é transferida para a rede, e o calor proveniente das nanopartículas é dissipado para o ambiente circundante. A utilização de AuNPs para a detecção, principalmente de células cancerígenas é possibilitada também devido ao fenômeno de ressonância de *plasmon* de superfície característico das AuNPs, ocorrendo a formação de uma densidade de carga em sua superfície possibilitando o acoplamento de moléculas para detecção colorimétrica e marcação de células (Sperling et al.<sup>7</sup> 2008, Bhattacharya e Mukherjee<sup>69</sup> 2008, Yamada et al.<sup>87</sup> 2015, Pereira<sup>89</sup> 2009).

Em busca realizada na literatura não foram encontrados trabalhos clínicos, *in vivo* ou *in vitro* a respeito da aplicação de AuNPs aplicados especificamente ao tratamento da doença periodontal.

As nanopartículas estão atualmente sendo desenvolvidas para aplicações em diversas áreas. No entanto, a sua utilização para aplicações biológicas exige uma compreensão detalhada das interações entre essas nanopartículas com os sistemas biológicos de células e órgãos com os quais elas possam entrar em contato (Hashimoto et al.<sup>80</sup> 2015, Alkilany e Murphy<sup>90</sup> 2010, Sabella et al.<sup>91</sup> 2014).

### **2.4.3. Mecanismo de ação das nanopartículas de ouro**

Compósitos de ouro têm sido utilizados desde 1930 e, apesar de seu mecanismo de ação permanecer incerto, existem evidências de que o ouro interfere na transmissão de sinais inflamatórios (Han et al.<sup>92</sup> 2008).

Já existem medicamentos com compostos de ouro e enxofre, como o Auranofin, que são amplamente utilizados no tratamento de doenças inflamatórias como a artrite reumatoide (Jeon et al.<sup>8</sup> 2003, Bondeson e Sundler<sup>93</sup> 1995).

As AuNPs têm recebido grande atenção por apresentar ação antioxidante e anti-inflamatória apontadas pela literatura podendo agir no organismo por diferentes mecanismos (Jeon et al.<sup>8</sup> 2003, Norton<sup>94</sup> 2008, Tsai et al.<sup>95</sup> 2007, Barathmanikanth et al.<sup>96</sup> 2010).

#### **2.4.3.1. AuNPs e NF- $\kappa$ B**

Estudos mostram que compostos de ouro apresentam uma importante ação anti-inflamatória devido a sua capacidade de inibir a expressão do NF- $\kappa$ B e consequentemente seus efeitos na inflamação, como a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (Jeon et al.<sup>8</sup> 2003, Bondeson e Sundler<sup>93</sup> 1995, Norton<sup>94</sup> 2008).

O NF- $\kappa$ B controla a expressão de diversos mediadores da resposta imune, e sua ativação exagerada está associada com várias doenças inflamatórias crônicas, como a artrite reumatoide, asma, doença inflamatória do intestino, colite ulcerativa,

aterosclerose (Barnes e Karin<sup>17</sup> 1997), além de importante papel na produção de mediadores inflamatórios da patogênese da doença periodontal. Esse bloqueio da ativação do NF- $\kappa$ B ocorre através da interação com o CYS-179 da enzima IKB quinase, um importante resíduo da estrutura molecular da enzima (Jeon et al.<sup>97</sup> 2000).

O entendimento da inibição da ativação das IK quinases por compostos de ouro irá ajudar no desenvolvimento de novas estratégias de tratamento de doenças inflamatórias (Barnes e Karin<sup>17</sup> 1997).

O Cys-179 está criticamente posicionado no círculo de ativação do IKB quinase, sugerindo que uma modificação nesse resíduo pode interferir na fosforilação das serinas adjacentes Ser-177 e Ser-181 e conseqüentemente a ativação na enzima. A ativação dessa enzima irá degradar a proteína I $\kappa$ B- $\alpha$  expondo a sequência sinal de localização nuclear do NF- $\kappa$ B permitindo a migração desse fator para o núcleo desencadeando a transcrição de RNAm para a produção de mediadores inflamatórios.

Estudo de Jeon et al.<sup>8</sup> (2003) mostrou a presença de grupos na molécula IKB quinase (diferente do Cys-179) o qual é sensível à oxidação ou modificação por espécies reativas. Porém, estudos mostram que a modificação da Cys-179 pelo ouro ou outros agentes reativos de enxofre interferem na formação da conformação ativa da enzima IKB quinase, mesmo quando as outras duas serinas residuais estão em estado fosforilado, sendo que a Cys-179 desempenha um papel central na conversão da forma inativa da enzima para sua forma ativa (Jeon et al.<sup>8</sup> 2003).

Em resumo, estudos apontam que o ouro e antirreumáticos com compostos de ouro inibem a ativação do NF- $\kappa$ B por modificar o resíduo Cys-179 da enzima IKB quinase, e seu efeito aparece através da inibição da ativação da enzima e conseqüentemente não possibilitando que o fator de transcrição NF- $\kappa$ B migre para o núcleo celular (Jeon et al.<sup>8</sup> 2003).

#### **2.4.3.2. AuNPs e produção de NO**

Outro efeito das AuNPs nas células apontado em estudos *in vitro*, é a diminuição da produção de NO e IFN- $\beta$  induzida por LPS em macrófagos. Isso ocorre

através da inibição conjunta das vias do NF- $\kappa$ B e do IFN- $\beta$ /STAT1 devido a sua ação inibitória tanto das vias MyD88-dependente e TRIF-dependente. A supressão de formação de iNOS pela via TRIF-dependente ocorre pela supressão da fosforilação do STAT1 pelo bloqueio de produção de IFN- $\beta$ . O co-tratamento das células com várias concentrações de AuNPs juntamente com LPS diminuiu significativamente a expressão da proteína iNOS de maneira dose-dependente, sugerindo que as AuNPs inibem a produção de NO através do bloqueio da expressão de iNOS a nível de transcrição (Ma et al.<sup>9</sup> 2010).

#### **2.4.3.3. AuNPs e EROs**

As AuNPs também podem interferir na atividade de eliminação e na atuação de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) geradas numa situação de estresse oxidativo.

Células aeróbicas podem sofrer com o dano oxidativo proveniente de uma condição de estresse oxidativo provocado pelo desequilíbrio entre a formação de espécies oxidantes (ou espécies reativas de oxigênio – EROs) e as defesas antioxidantes (Halliwell e Gutteridge<sup>98</sup> 1999, Dalle-Donne et al.<sup>99</sup> 2006). As EROs são definidas como qualquer espécie química capaz de existir independentemente e que contenha um ou mais elétrons desemparelhados sendo altamente reativas pela situação energeticamente instável (Halliwell e Gutteridge<sup>98</sup> 1999, Southorn e Powis<sup>100</sup> 1988) As EROs atuam também como importantes moléculas de sinalização na progressão de doenças inflamatórias. Sob condições inflamatórias o estresse oxidativo gerado pelo aumento da formação de EROs por neutrófilos polimorfonucleares promove a abertura das junções entre células endoteliais facilitando a migração de células inflamatórias através da barreira endotelial. Tais células não irão só ajudar na eliminação dos patógenos, mas também ocasionam danos teciduais (Ma et al.<sup>9</sup> 2010, Mittal et al.<sup>101</sup> 2014).

Os oxidantes provenientes do estado de estresse oxidativo celular podem ativar o NF- $\kappa$ B levando a produção de mediadores que acentuam a inflamação levando a danos teciduais (Adcock et al.<sup>102</sup> 1994, Haddad<sup>103</sup> 2002). Estudos demonstram que algumas quinases são ativadas quando oxidadas, o que culmina na fosforilação de I $\kappa$ B e dissociação do complexo formado com o NF- $\kappa$ B, com sua posterior ubiquitinação

e degradação (Haddad<sup>104</sup> 2002, Kamata e Hirata<sup>105</sup> 1999). Assim, a presença de um estado tendendo à oxidação pode ser um fator importante para ativação de vias que regulam a atividade de genes dependentes de NF- $\kappa$ B.

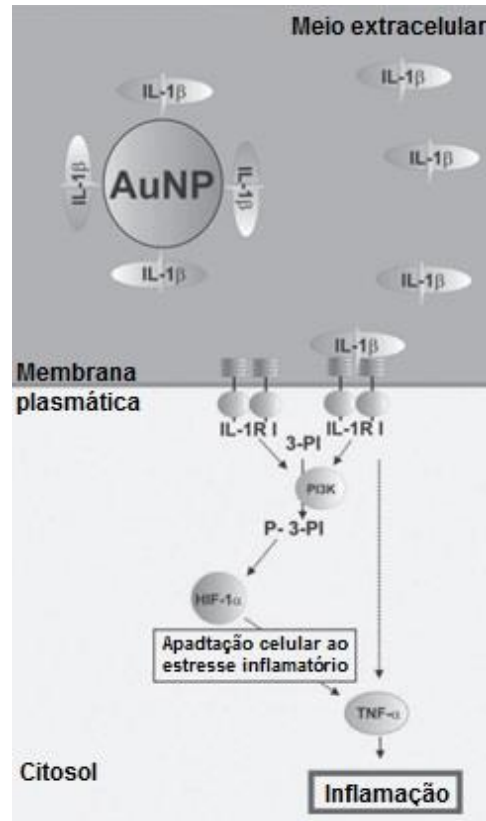
Além de as AuNPs poderem atuar na inibição da ativação do NF- $\kappa$ B, elas também apresentam capacidade antioxidante através da interação direta com essas EROs. Tratamento com AuNPs aumenta a atividade de eliminação de radicais superóxido cerca de 60%, ainda que não de maneira dependente da dose (Ma et al.<sup>9</sup> 2010)

Estudo que utilizou o tratamento com nanopartículas de ouro aliado a fonoforese sugere que o tratamento tem efeito antioxidante e, conseqüentemente diminuição dos níveis de citocinas pró-inflamatórias. O tratamento diminui a exposição dos tecidos a espécies reativas de oxigênio, diminuindo assim os danos estruturais causados por essa exposição e provavelmente tornando mais breve a fase aguda da inflamação (Victor et al.<sup>106</sup> 2012).

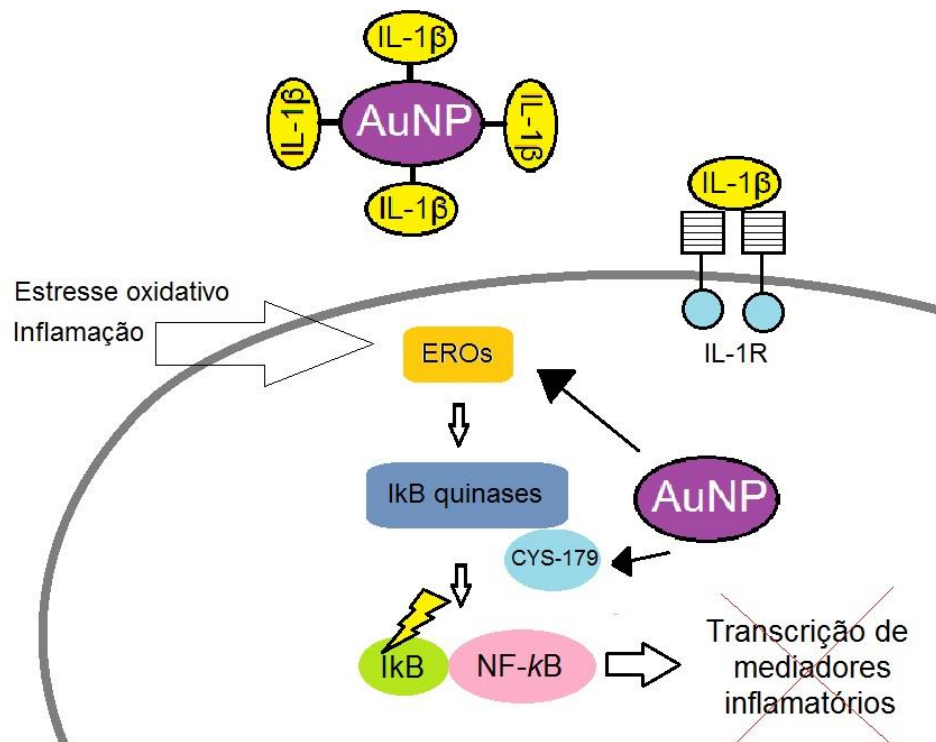
#### **2.4.3.3. AuNPs e IL-1 $\beta$**

Resultados de estudo realizado por Sumbayev et al.<sup>10</sup> (2013) indicam que a atividade anti-inflamatória das AuNPs está associada com sua habilidade de interação extracelular com a IL-1 $\beta$ , onde moléculas de IL-1 $\beta$  se agregam ao redor das AuNPs (Figura 4). Esses agregados reduzem o número de moléculas disponíveis de IL-1 $\beta$  que podem interagir com o receptor celular de interleucina, diminuindo então significativamente as propriedades inflamatórias dessa citocina. AuNPs estabilizadas com citrato, de acordo com seu diâmetro, regulam negativamente as respostas celulares induzidas por IL-1  $\beta$  tanto *in vitro* como *in vivo*. Foram testadas AuNPs nos diâmetros de 5, 15, 20 e 35 nm, sendo que as que apresentaram inibição mais significativa foram as de 5 nm, numa concentração de 20  $\mu$ M.





**Figura 4.** Possível mecanismo de ação das AuNPs na diminuição das respostas celulares induzidas por IL-1β. Adaptado de Sumbayev et al.<sup>10</sup> (2013).

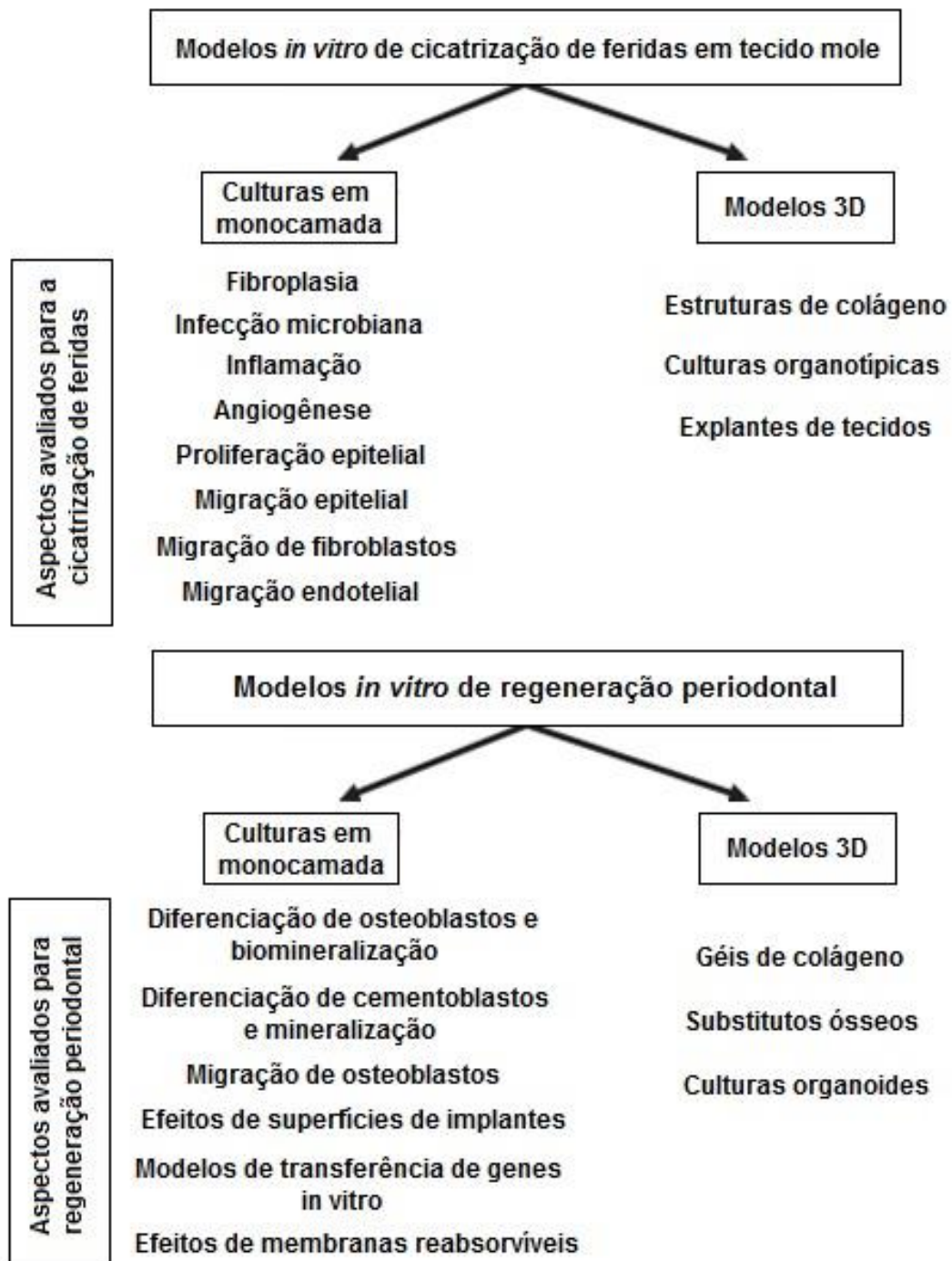


**Figura 5.** Representação esquemática dos mecanismos de ação anti-inflamatória e antioxidante propostos para as AuNPs.

## 2.5. Cultura de células como modelo *in vitro* para estudo da doença periodontal

Modelos que estudam o tratamento da doença periodontal buscam a restauração dos tecidos destruídos por essa doença inflamatória infecciosa com tecidos que tenham a mesma estrutura e função dos tecidos perdidos. A regeneração periodontal ideal requer: recuperação da altura do osso alveolar, a formação de novas fibras extrínsecas inseridas no cimento da superfície radicular, a síntese de fibras de Sharpey que se inserem no cimento e o reestabelecimento de tecidos moles responsáveis pelo selamento da interface gengival (Weinreb e Nemcovsky<sup>107</sup> 2015, Bosshardt et al.<sup>108</sup> 2015).

Dentre os modelos experimentais para estudo da doença periodontal *in vitro* está a utilização da cultura de células. Vários ensaios com células cultivadas em monocamadas ou em modelos 3D podem ser realizados para avaliação da cicatrização de feridas e regeneração do tecido periodontal, como demonstrado na figura 6 (Weinreb e Nemcovsky<sup>107</sup> 2015).



**Figura 6.** Representação esquemática dos possíveis aspectos para avaliação *in vitro* da cicatrização e regeneração periodontal. Adaptado de Weinreb e Nemcovsky<sup>107</sup> (2015).

Os macrófagos têm papel importante na patologia da doença periodontal, assim como todas as doenças que envolvem mecanismos inflamatórios como parte de sua patologia. Macrófagos desempenham importantes papéis na resposta imune contra

várias infecções bacterianas e virais através da secreção de NO e citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e interleucina 6 (IL-6) (Ma et al.<sup>9</sup> 2010). O óxido nítrico derivado dos macrófagos tem papel fundamental na proteção contra infecções microbianas em respostas imunes. Mas a produção elevada de NO pela iNOS já demonstrou estar correlacionada com a patologia de várias doenças inflamatórias. (Ma et al.<sup>9</sup> 2010).

Na periodontite, os macrófagos são recrutados para a área inflamada e ativados pelo reconhecimento do LPS levando a produção de prostaglandinas, interleucinas, TNF- $\alpha$  e MMPs. Interleucinas e TNF- $\alpha$  se ligam a fibroblastos, estimulando-os a produzir quantidades adicionais de prostaglandinas, interleucinas, TNF- $\alpha$  e MMPs formando um ciclo *feedback*-positivo (Caton e Ryan<sup>4</sup> 2011). Fibroblastos e macrófagos são células essenciais tanto no processo inflamatório quanto no processo de reparo e reconstituição da estrutura periodontal após o tratamento da doença. Sendo assim importante avaliar a resposta dessas células perante possíveis tratamentos para a doença periodontal.

A partir de um modelo *in vitro* de cultura de células em monocamada, vários aspectos relevantes para a cicatrização de feridas e regeneração periodontal podem ser analisados, como: proliferação celular, produção e secreção de proteínas, viabilidade, migração, expressão gênica e diferenciação (Weinreb e Nemcovsky<sup>107</sup> 2015).

Estudos para o tratamento da doença periodontal buscam também a modulação da resposta inflamatória visando a limitação da destruição tecidual, visto que a destruição tecidual encontrada na periodontite resulta da própria reação imune nos tecidos periodontais em resposta a presença prolongada do biofilme bacteriano (Caton e Ryan<sup>4</sup> 2011, Pihlstrom et al.<sup>5</sup> 2005). Encurtar ou minimizar a fase inflamatória dos tecidos pode ajudar no processo de cicatrização, especialmente em um ambiente como a cavidade bucal onde bactérias e microrganismos estão sempre presentes (Weinreb e Nemcovsky<sup>107</sup> 2015). Para avaliar essa condição de maneira *in vitro* podemos testar as propriedades anti-inflamatórias de produtos, como mensurando a produção de mediadores inflamatórios após sensibilizar células com compostos inflamatórios.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

Avaliar o perfil citotóxico e potencial anti-inflamatório de Nanopartículas de ouro (AuNPs) em modelos *in vivo* de inflamação aguda e em cultura de células de fibroblastos (3T3) e macrófagos (RAW 264.7).

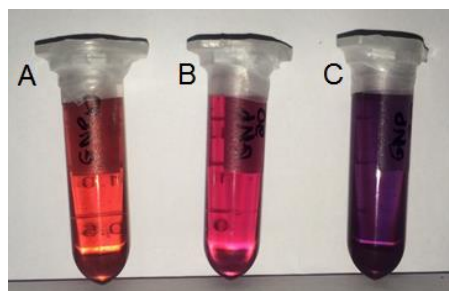
#### 3.2. Objetivos específicos

- I. Caracterização das AuNPs através de Espectroscopia no Ultravioleta-visível (UV-Vis), Difractometria de raios-x (DRX), Potencial Zeta, Espectrofotometria de absorção atômica e Microscopia eletrônica de varredura por canhão de emissão de campo elétrico (FEG);
- II. Verificar o efeito *in vivo* do tratamento tópico com formulações de AuNPs em modelo agudo de inflamação em camundongos de edema de orelha induzido por TPA;
- III. Verificar o efeito *in vivo* do tratamento tópico com formulações de AuNPs em modelo agudo de inflamação em camundongo de edema de pata induzido por LPS;
- IV. Verificar o efeito do tratamento com as AuNPs na viabilidade celular de fibroblastos (3T3) e macrófagos (RAW 264.7) através dos ensaios de Thyazoly Blue Tetrazoliumbromide (MTT), Vermelho Neutro (VN) e teste de exclusão do azul de tripan;

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

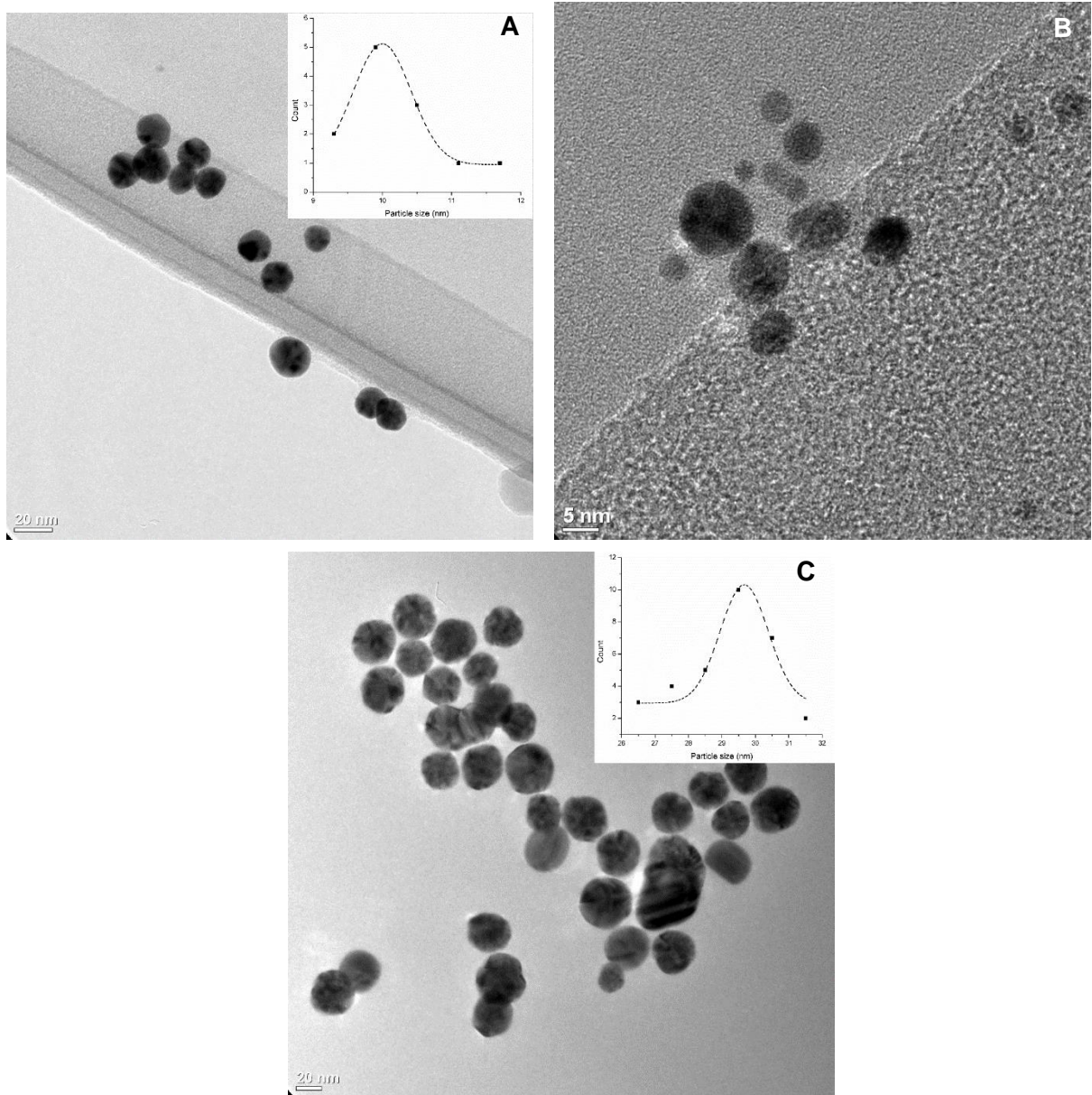
### 4.1. Síntese das nanopartículas de ouro

As nanopartículas de ouro (AuNPs) foram sintetizadas no laboratório de Síntese e Complexos Multifuncionais da Universidade do Extremo Sul Catarinense/UNESC, em Criciúma/SC. AuNPs de tamanhos médios de 10, 20 e 30 nm foram sintetizadas como descrito por Turkevich e colaboradores (Turkevich et al.<sup>109</sup> 1951) com pequenas modificações. O processo de síntese foi realizado a partir de redução química do precursor metálico ácido tetracloroáurico ( $\text{HAuCl}_4$ ) (Sigma-Aldrich, MO, EUA) com o agente redutor e estabilizante citrato de sódio ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) (Nuclear, SP, Brasil). O controle da dimensão das nanopartículas foi realizado variando-se a concentração de citrato de sódio. Inicialmente, 100 mL de 0,50 mM de ácido tetracloroáurico foram transferidos para um balão de fundo redondo e a solução aquecida até 90 °C sob agitação a 700 rpm. A solução de citrato de sódio, previamente preparada, foi então adicionada, e o sistema foi mantido à temperatura descrita, agitando a 200 rpm durante 20 minutos. As soluções adquirem as colorações correspondentes a cada tamanho de AuNPs sintetizadas, como pode ser observado na figura 7, corroborando com a literatura (Pereira<sup>89</sup> 2009, Alkilany e Murphy<sup>90</sup> 2010, Philip<sup>110</sup> 2008). As dispersões de AuNPs apresentavam pH de 5,8 ao final do processo de síntese. Então, o pH era ajustado ao pH fisiológico com solução tampão e, posteriormente, centrifugadas (13.000 rpm por 15 min) e lavadas duas vezes com água ultrapura para posteriormente serem obtidas as dispersões coloidais nas concentrações de trabalho realizadas a partir de diluições em água destilada estéril.



**Figura 7.** Coloração das dispersões de nanopartículas de ouro: A) AuNPs - 10 nm; B) AuNPs - 20 nm; e C) AuNPs - 30 nm.

Após a síntese das nanopartículas, amostras foram encaminhadas para Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) para verificar seu diâmetro e formato para confirmar se as nanopartículas apresentavam o formato esférico e os diâmetros médios de 10, 20 e 30 nm como proposto pelo método de síntese. As imagens mostraram que os diâmetros estavam adequados, como apresentado na figura 8, e corroborando com o formato e com os diâmetros propostos, estabelecendo-se assim um método padrão para síntese de nanopartículas de ouro de 10, 20 e 30 nm.



**Figura 8.** Microscopia eletrônica de transmissão de AuNPs-10 nm, AuNPs-20 nm e AuNPs-30 nm. Nanopartículas de ouro esféricas preparadas em dispersão aquosa. A) Nanopartículas de ouro de 10 nm de diâmetro. A barra de escala equivale a 20 nm. B) Nanopartículas de ouro de 20 nm de diâmetro. A barra de escala equivale a 5 nm. C) Nanopartículas de ouro de 30 nm de diâmetro. A barra de escala equivale a 20 nm. Fonte: UDESC.

## 4.2. Caracterização das nanopartículas de ouro

### 4.2.1. Espectroscopia de absorção no ultravioleta-vísivel (UV-Visível)

Após a síntese, as dispersões de AuNPs foram caracterizadas empregando-se a técnica de espectroscopia de absorção no ultravioleta-visível (UV-Vis), via monitoramento da banda de superfície de *plasmon* ressonante (SPR), em espectrofotômetro modelo UV-1800, através do equipamento de LAB-X, modelo XDR – 6000 (Shimadzu). Para a espectrometria de UV-visível, a medição da banda de SRP foi realizada a temperatura ambiente num espectrofotômetro utilizando uma cubeta de quartzo contendo uma alíquota de 1 mL de cada uma das dispersões. O espectro eletrônico das dispersões foi monitorado diariamente ao longo de uma semana com o objetivo de revelar qualquer alteração do comprimento de onda na máxima absorção.

### 4.2.2. Difratometria de Raios-X

Para identificação de estruturas cristalinas e comparação dos ângulos de reflexão das amostras com os padrões de reflexão do ouro, foi realizada a difratometria de raios-X (DRX) das amostras. Para medidas de DRX, uma alíquota de 9 mL da dispersão de AuNPs foi centrifugada a 10.000 rotações por minuto por 10 minutos. O sobrenadante foi removido e o material sedimentado transferido para um porta amostra e acondicionado em estufa para secagem. O material foi caracterizado sob os seguintes parâmetros: Comprimento de onda ( $\lambda$ ) da radiação ( $K\alpha$ ) do tubo de cobre a 1.54056 Å, voltagem de 30 kV, corrente 30 mA, velocidade de varredura: 2°/min, ao passo de medidas 0.02°, entre 20-80° (Balasubramanian et al.<sup>111</sup> 2010) em configuração  $\theta\theta$ .

Buscamos verificar o ângulo de refração indicado por cada pico a partir da largura da banda à meia altura para se encontrar o centro do pico e verificar seu valor de refração e compará-lo com os ângulos de refração característicos do ouro.



A partir da medida da largura à meia altura da banda SRP com sinal de maior intensidade foi calculado o diâmetro médio das AuNPs aplicando-as na equação de Scherrer  $2\theta = 38^\circ$  (Yan et al.<sup>112</sup> 2005).

$$D = \frac{k\lambda}{\beta \cos(\theta)}$$

Onde, D é Diâmetro médio, K = 0,94, uma constante característica das partículas esféricas,  $\lambda$  é comprimento de onda (radiação  $\kappa_\alpha$  usada): 1,54056;  $\beta$ : Largura da banda a meia altura (total na metade máxima do pico em radianos) e  $\theta$ : Ângulo de Bragg (do pico de 100% de intensidade) (Balasubramanian et al.<sup>111</sup> 2010).

#### 4.2.3. Potencial Zeta

Quase todos os materiais particulados em contato com um líquido adquirem uma carga elétrica em sua superfície. O potencial zeta é função da carga superficial da partícula, de qualquer camada adsorvida na interface com o meio e da natureza e composição do meio que a circunda. Esse potencial pode ser determinado experimentalmente sendo um indicador útil da carga de superfície, podendo ser usado para prever e controlar a estabilidade de soluções ou dispersões coloidais (Martins<sup>113</sup> 2007).

O valor de potencial Zeta de uma nanopartícula é um parâmetro útil para verificar a estabilidade da solução ou dispersão coloidal, sendo consideradas estáveis as que apresentam valores de potencial Zeta superiores a +30 mV ou inferiores a -30 mV (Clogston e Patri<sup>114</sup> 2011, Wu et al.<sup>115</sup> 2011).

As dispersões de AuNPs foram mantidas em temperatura ambiente, transferidas para eppendorfs de 2 mL, levadas ao banho ultrassônico por 8 minutos e então encaminhadas para análise do Potencial Zeta, (ZetaPALS; Brookhaven Instruments, Nova Iorque, EUA) no Complexo de Laboratórios Multiusuários da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

#### **4.2.4. Espectrofotometria de absorção atômica**

A concentração de ouro nas dispersões foi confirmada através de mensuração por espectrofotometria de absorção atômica (EAA) utilizando um espectrofotômetro modelo AA240 FS-FAST (Varian model AA 240Z; Varian Medical Systems, Inc., Palo Alto, CA, USA). A partir dessa concentração foram realizadas as diluições em água destilada estéril de modo que após serem adicionadas nos poços de cultura adquirissem as concentrações utilizadas no experimento que foram de: 1,25; 5; 15 e 35 mg/L.

#### **4.2.5 Microscopia eletrônica de varredura por canhão de emissão de campo elétrico (FEG)**

Para caracterização morfológica das nanopartículas foram obtidas imagens das dispersões coloidais de AuNPs de 10, 20 e 30 nm por Microscopia eletrônica de varredura por canhão de emissão de campo elétrico (FEG “Field Emission Gun”) modelo Mira 3, Tescan. O teste de caracterização foi realizado no Complexo de Laboratórios Multiusuários da Universidade Estadual de Ponta Grossa a fim de verificar se o formato esférico das nanopartículas empregadas nos experimentos do presente estudo foi preservado, como comprovado por imagens de TEM para o estabelecimento do método de síntese na UDESC. Cada dispersão de AuNPs foi sonicada em banho ultrassônico por 10 minutos, homogeneizada em Vortex e em seguida transferidos 10  $\mu$ L de cada amostra para um porta-amostra (stab) e acondicionados em estufa para secagem, mantidos cobertos para evitar deposição de resíduos na superfície do porta-amostra. Os porta-amostras foram previamente limpos com Acetona P.A. para remoção de impurezas e irregularidades. Imediatamente antes da leitura, os porta-amostras foram submetidos ao processo de metalização em metalizador Quorum com liga de ouro e paládio por 3 minutos a 15 mA, para facilitar o contraste e melhor definição das imagens de microscopia.

### 4.3. Modelo *in vivo*

#### 4.3.1. Animais

Foram utilizados ao todo 80 camundongos swiss machos (PESO E IDADE). Os animais foram mantidos no Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR) com ciclo de claro/escuro de 12 h, com ração e água *ad libitum*.

O trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/BIO-UFPR) da Universidade Federal do Paraná, sob o número de protocolo 610.

#### 4.3.2. Aplicação tópica de formulações de AuNPs em modelo animal de edema de orelha

Para verificar de maneira *in vivo* o potencial anti-inflamatório da aplicação tópica de AuNPs, formulações foram testadas em modelo de edema de orelha em camundongos. As AuNPs de 10 nm foram incorporadas em formulações em creme e loção nas concentrações de 0,06%, 0,1% e 0,6%. O edema de orelha em camundongos foi induzido com a aplicação tópica de TPA seguido da aplicação tópica das formulações de AuNPs. O TPA (12-0- tetradecanoylphorbol-13-acetate) é um agente flogístico éster de forbol presente no óleo de cróton (*Croton tiglium*L.) com capacidade de ativação da inflamação por estimular a produção de metabólitos do ácido araquidônico (Young et al.<sup>116</sup> 1983), sendo assim um modelo interessante para verificar a atuação das AuNPs, tendo em vista que a expressão gênica da ciclooxigenase-2 pode ser regulada pela ativação do NF-kB (Lee et al.<sup>117</sup> 2004).

Foram utilizados 40 camundongos Swiss machos, sendo 5 animais por grupo. O edema foi induzido na orelha direita de cada animal por aplicação tópica de 2,5 µg de TPA diluído em 20 µL de acetona, seguido pela imediata aplicação das formulações de AuNPs de 10 nm conforme indicado pelo grupo, sendo realizada outra aplicação

após 6h. A aplicação de dexametasona (0,05 mg/orelha em 20 µL de acetona) foi realizada para controle.

Divisão dos grupos:

- 1) Controle (apenas aplicação de TPA)
- 2) TPA + Dexametasona
- 3) TPA + AuNPs 0,6% em creme
- 4) TPA + AuNPs 0,1% em creme
- 5) TPA + AuNPs 0,06% em creme
- 6) TPA + AuNPs 0,6% em creme
- 7) TPA + AuNPs 0,1% em loção
- 8) TPA + AuNPs 0,06% em loção

O edema foi quantificado pelo aumento na espessura da orelha 6 e 24h após a aplicação do agente inflamatório, sendo que após a mensuração de 6h foi realizada outra aplicação das formulações. A espessura da orelha dos animais foi medida com micrômetro digital (Great, MT-045B) em região medial da orelha distalmente à saliência cartilaginosa e registrada em micrômetros (µm). Todas as aferições foram realizadas pelo mesmo operador calibrado para diminuir variações provenientes do método.

Sequencialmente, o experimento foi repetido com o grupo controle (TPA), o grupo que recebeu a formulação que obteve melhor resultado e um grupo tratado apenas com o veículo utilizado para a formulação (15 animais). Esse experimento foi realizado a fim de descartar a possibilidade de os resultados obtidos terem sido induzidos apenas pela aplicação do veículo ao invés da ação das AuNPs.

#### **4.3.3. Aplicação tópica de formulações de AuNPs em modelo animal de edema de pata induzido por LPS**

O LPS é um lipopolissacarídeo encontrado na membrana celular de bactérias gram-negativas capaz de elevar sua patogenicidade, como em diversas espécies

bacterianas envolvidas no processo infeccioso da doença periodontal. Esse componente pode dificultar a neutralização por anticorpos e a ação de antibióticos sobre esse grupo de bactérias (Abbas et al.<sup>15</sup> 2012). Assim, o modelo de edema de pata induzido pela administração de LPS permite testar uma substância quanto a seu potencial anti-inflamatório tópico ou sistêmico (dependendo da via de administração) através da indução de um estímulo inflamatório local com envolvimento de um componente bacteriano (Sponchiado<sup>118</sup> 2015).

Foram utilizados 25 animais distribuídos em 5 grupos, com 5 animais em cada grupo. As mesmas formulações de AuNPs foram utilizadas, sendo que para esse teste foram selecionadas apenas as duas formulações em creme que obtiveram os melhores resultados em 24h no teste do edema de orelha, visto que as formulações em loção apresentavam consistência muito líquida após a adição da dispersão de AuNPs dificultando assim controlar a permanência da formulação em contato com o animal pelo tempo adequado.

A espessura da pata traseira direita de cada animal foi mensurada com auxílio de micrômetro digital, antes da indução do edema (espessura basal). A pata traseira direita de cada animal recebeu a aplicação das formulações de AuNPs, veículo (creme não-iônico) ou dexametasona (creme a 5%) conforme o grupo. Após 30 minutos, o edema foi induzido na pata direita traseira de cada animal pela administração intraplantar (i.pl.) de 30 µL de solução de LPS (5 µg/pata diluído em solução salina 0,9%) segundo protocolo de Levy<sup>119</sup> (1969) e Sponchiado<sup>118</sup> (2015) com algumas adaptações. Após uma hora a espessura da pata dos animais foi determinada novamente, quantificando assim o edema. Todas as aferições foram realizadas pelo mesmo operador para diminuir variações provenientes do método.

Divisão dos grupos:

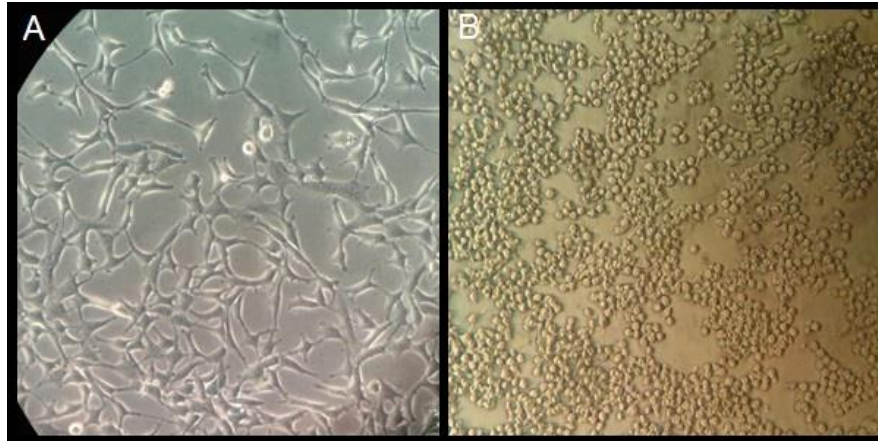
- 1) Controle (apenas aplicação de LPS)
- 2) Veículo (creme não-iônico) + LPS
- 3) Dexametasona em creme 5% + LPS
- 4) AuNPs 0,1% em creme + LPS
- 5) AuNPs 0,6% em creme + LPS

#### 4.4. Modelo *in vitro* - Cultura de células

##### 4.4.1. Cultivo de Fibroblastos 3T3 e Macrófagos RAW 264.7

Os fibroblastos 3T3 e macrófagos RAW 264.7 provenientes do banco de células do Rio de Janeiro foram cultivados em Meio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) em garrafas de cultura mantidas em ambiente umidificado a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de cultura era trocado a cada 2 dias. Ambas as espécies celulares apresentavam tempo de dobramento de 2 dias. Após a monocamada celular atingir confluência as células eram lavadas com solução de PBS estéril. Para o desprendimento dos fibroblastos a garrafa era incubada por 5 minutos com 3 mL de tripsina 0,25%. Após as células desaderirem do fundo da garrafa era adicionado igual volume de DMEM a 10% de SFB. Em cultura de macrófagos as células eram desaderidas da garrafa com o auxílio de um “*scraper*”. As células eram então homogeneizadas em DMEM a 10% de SFB e a suspensão celular era transferida para outras garrafas. Ao início de cada experimento era realizada a contagem das células em câmara de Neubauer para determinação da proporção de células por poço. Para o procedimento de contagem, após as células desaderirem da garrafa, a suspensão celular era centrifugada, o sobrenadante descartado e o *pellet* celular ressuspendido em 1 mL de DMEM a 1% de SFB. Uma alíquota de 10 µL da suspensão celular era acrescida em 10 µL de solução de azul de tripan e realizada contagem em câmara de Neubauer. Em seguida, o número de células era multiplicado pelo fator de diluição (2) e por 10<sup>4</sup>, para quantificação do número de células presentes na suspensão de 1 mL, como demonstrado na equação abaixo.

$$N^{\circ} \text{ de células em } 1 \text{ mL} = n^{\circ} \text{ de células contadas} \times 2 \times 10^4$$



**Figura 9.** Visualização das células utilizadas do estudo obtidas em microscópio invertido. A) Fibroblastos 3T3. B) Macrófagos RAW 264.7.

#### **4.4.2 Avaliação do efeito das AuNPs na viabilidade celular de fibroblastos e macrófagos pelo ensaio de Thiazolyl Blue Tetrazoliumbromide (MTT)**

Foi avaliado o efeito das dispersões de AuNPs de 10, 20 e 30 nm de diâmetro nas seguintes concentrações: 1,25; 5; 15 e 35 mg/mL, nos períodos de 12, 24 e 48 horas na viabilidade celular de fibroblastos 3T3 e macrófagos RAW 264.7, através do ensaio do Thiazolyl blue tetrazoliumbromide (MTT).

O MTT é indicado para determinação do número de células vivas com atividade mitocondrial intacta através de espectrofotometria, podendo ser utilizado como medida de viabilidade celular. Trata-se de um método colorimétrico que verifica a atividade da enzima desidrogenase mitocondrial em reduzir o corante 3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-brometodifeniltetrazolium (MTT) produzindo cristais de formazan insolúveis em água, passando da coloração amarela para púrpura. Ao adicionar o agente solubilizante dos cristais ocorre a ruptura das membranas celulares liberando o formazan (corante) para análise espectrofotométrica a 570 nm (Mosmann<sup>120</sup> 1983).

Os fibroblastos 3T3 e macrófagos RAW 264.7 foram plaqueados na proporção de  $0,14 \times 10^5$  células/poço em placas de 96 poços com DMEM a 1% de SFB. Após incubação das placas por 24h em incubadora a 5% de CO<sub>2</sub> e 37°C o meio foi removido e adicionado DMEM a 1% SFB com as dispersões de AuNPs nas concentrações de 35, 15, 5 e 1,25 mg/L, sendo cada concentração adicionada em triplicata. Poços que receberam apenas DMEM a 1% SFB sem tratamento foram utilizados como controle.

Os testes de citotoxicidade foram realizados após 12, 24 e 48h de tratamento das células com as dispersões de AuNPs. Após a incubação das células com o tratamento pelo período determinado o sobrenadante dos poços foi removido e aplicado 200 µL de solução de MTT a 0,5 mg/mL. As placas foram mantidas por 3h em incubadora de CO<sub>2</sub>. Em seguida, o conteúdo da placa foi descartado invertendo-a e adicionado 200 µL de etanol em cada poço. A placa foi mantida em agitador de placas por 10 minutos e o conteúdo de cada poço lentamente homogeneizado para dissolução dos cristais. Por fim, foi feita leitura da absorbância dos poços da placa por espectrofotometria em leitor de microplaca a 570 nm. Os experimentos foram realizados ao menos 3 vezes.

Após obter os valores de absorbância foi calculada a viabilidade celular dos fibroblastos e macrófagos que receberam os diferentes tratamentos em comparação com o controle. Os poços que recebem apenas DMEM a 1% de SFB foram considerados como 100% de viabilidade celular.

#### **4.4.3. Avaliação do efeito das AuNPs na viabilidade celular de fibroblastos e macrófagos pelo ensaio de Vermelho Neutro**

Também foi avaliado o perfil citotóxico das dispersões coloidais de AuNPs de 10, 20 e 30 nm de diâmetro nas seguintes concentrações: 1,25; 5; 15 e 35 mg/mL, nos períodos de 12, 24 e 48 horas na viabilidade celular de fibroblastos 3T3 e macrófagos RAW 264.7, através do ensaio do Vermelho Neutro (VN).

O ensaio de incorporação de vermelho neutro proporciona uma estimativa quantitativa do número de células viáveis em cultura, sendo um dos testes de citotoxicidade mais utilizados. O teste é fundamentado na capacidade de células viáveis incorporar e se ligar ao corante. Trata-se de um corante catiônico fraco que penetra as membranas celulares por difusão passiva não-iônica concentrando-se nos lisossomos, onde se liga por ligações eletrostáticas hidrofóbicas a grupos aniônicos ou fosfato na matriz lisossomal (Repetto et al.<sup>121</sup> 2008).

Os fibroblastos 3T3 e macrófagos RAW 264.7 foram plaqueados na proporção de  $0,14 \times 10^5$  células/poço em placas de 96 poços com DMEM a 1% de SFB. Após incubação das placas por 24h em incubadora a 5% de CO<sub>2</sub> e 37°C o meio foi removido e adicionado DMEM a 1% SFB com as dispersões de AuNPs nas concentrações de



35, 15, 5 e 1,25 mg/L, sendo cada concentração adicionada em triplicata. Poços que receberam apenas DMEM a 1% SFB sem tratamento foram utilizados como controle. Os testes de citotoxicidade foram realizados após 12, 24 e 48h de tratamento das células com as dispersões de AuNPs. Após a incubação das células com o tratamento pelo período determinado, o sobrenadante foi descartado e foram pipetados 200 µL de solução de Vermelho neutro a 0,5% em DMEM a 1% de SFB previamente centrifugada e a mantida por 30 minutos a 37°C. As células foram incubadas com o corante por 3 horas. Após o tempo de ação do corante, fora do fluxo laminar, o sobrenadante foi descartado, os poços lavados com solução de formaldeído e CaCl<sub>2</sub> e pipetado 200 µL de solução de ácido acético e etanol. As placas eram então levadas ao agitador de placas por 10 minutos até a completa dissolução do corante e então realizada leitura de absorbância em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 540 nm. Os experimentos foram realizados ao menos 3 vezes.

Após obter os valores de absorbância foi calculada a viabilidade celular dos fibroblastos e macrófagos que receberam os diferentes tratamentos em comparação com o controle. Os poços que recebem apenas DMEM a 1% de SFB foram considerados como 100% de viabilidade celular.

#### **4.4.4. Avaliação do efeito das AuNPs na viabilidade celular de macrófagos e fibroblastos pelo método de exclusão do azul de tripan**

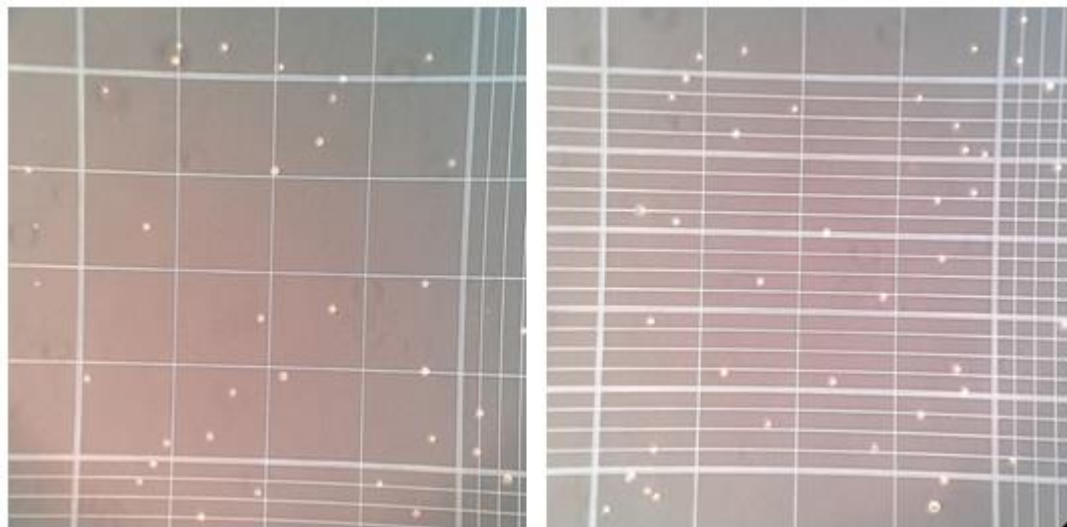
A análise de viabilidade celular de fibroblastos 3T3 e macrófagos RAW 264.7 realizada através do teste de exclusão do corante azul de tripan foi realizada de acordo com protocolo descrito por Barile<sup>122</sup> (1994) e Silveira<sup>123</sup> (2011) com pequenas modificações. As células foram plaqueadas na proporção de  $1 \times 10^5$  (para 12h) e  $1 \times 10^4$  (para 24 e 48h) células/poço em placa de 96 poços. Após 24h foram aplicados nos poços em duplicata as dispersões de AuNPs de 10, 20 e 30 nm nas concentrações de 1,25; 5; 15 e 35 mg/mL, sendo utilizados poços com apenas DMEM a 1% de SFB para controle. Foi verificada a viabilidade de fibroblastos e macrófagos após 12, 24 e 48h. Após o período determinado, o meio foi removido dos poços, sendo estes lavados com PBS. As células foram desaderidas dos poços com a aplicação de 100 µL de solução de tripsina/EDTA (0,05%/0,02%) por 5 minutos e seguido pela adição de igual

volume de DMEM a 1% de SFB. Uma alíquota de 10  $\mu$ L de cada poço foi adicionada a 10  $\mu$ L de azul de tripan a 0,4%, a solução foi homogeneizada e transferida para câmara de Neubauer. Foi realizada a contagem de células em quatro quadrantes diferentes, diferenciando-se as formas viáveis, que permaneciam translúcidas devido a integridade da membrana celular que impede a penetração do corante, de inviáveis, que foram coradas em azul pela penetração do corante através da membrana celular danificada, por visualização em microscópio invertido (AxioVert 40 CFL).

Para o cálculo da viabilidade celular a seguinte fórmula foi aplicada a cada quadrante contado:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{\text{número de células viáveis}}{\text{total de células contadas}} \times 100$$

Os dados obtidos foram expressos como porcentagem do total de células viáveis em comparação ao grupo controle que não recebeu qualquer tipo de tratamento, sendo considerada nesses poços como 100% de viabilidade celular.



**Figura 10.** Contagem de células RAW 264.7 em câmara de Neubauer no teste de exclusão do azul de tripan através de visualização em microscópio invertido.

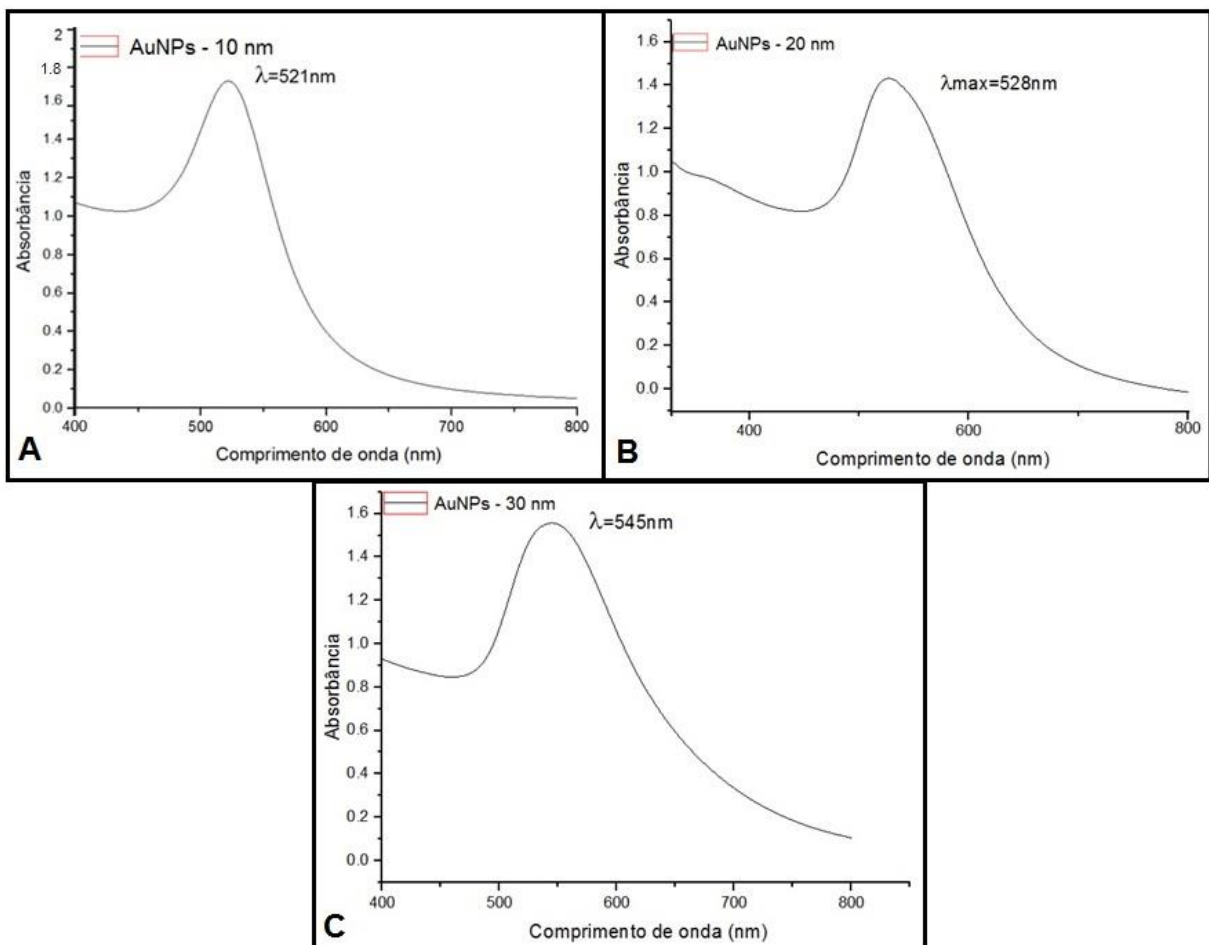
#### 4.5. Análise Estatística

Os dados foram analisados usando a Análise de Variância de ANOVA de uma via, e aplicado pós-teste de Tukey quando foi encontrada diferença significativa entre os grupos, sempre após ser verificada a normalidade dos dados com o teste de Shapiro-Wilk. Os dados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. com intervalo de confiança de 95%, sendo valores de P menores que 0,05 ( $p < 0,05$ ) considerados como indicativos de significância. As análises foram realizadas em software estatístico GraphPad Prism, São Diego, Califórnia, EUA (versão 5).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Caracterização das Nanopartículas de ouro de 10, 20 e 30 nm:

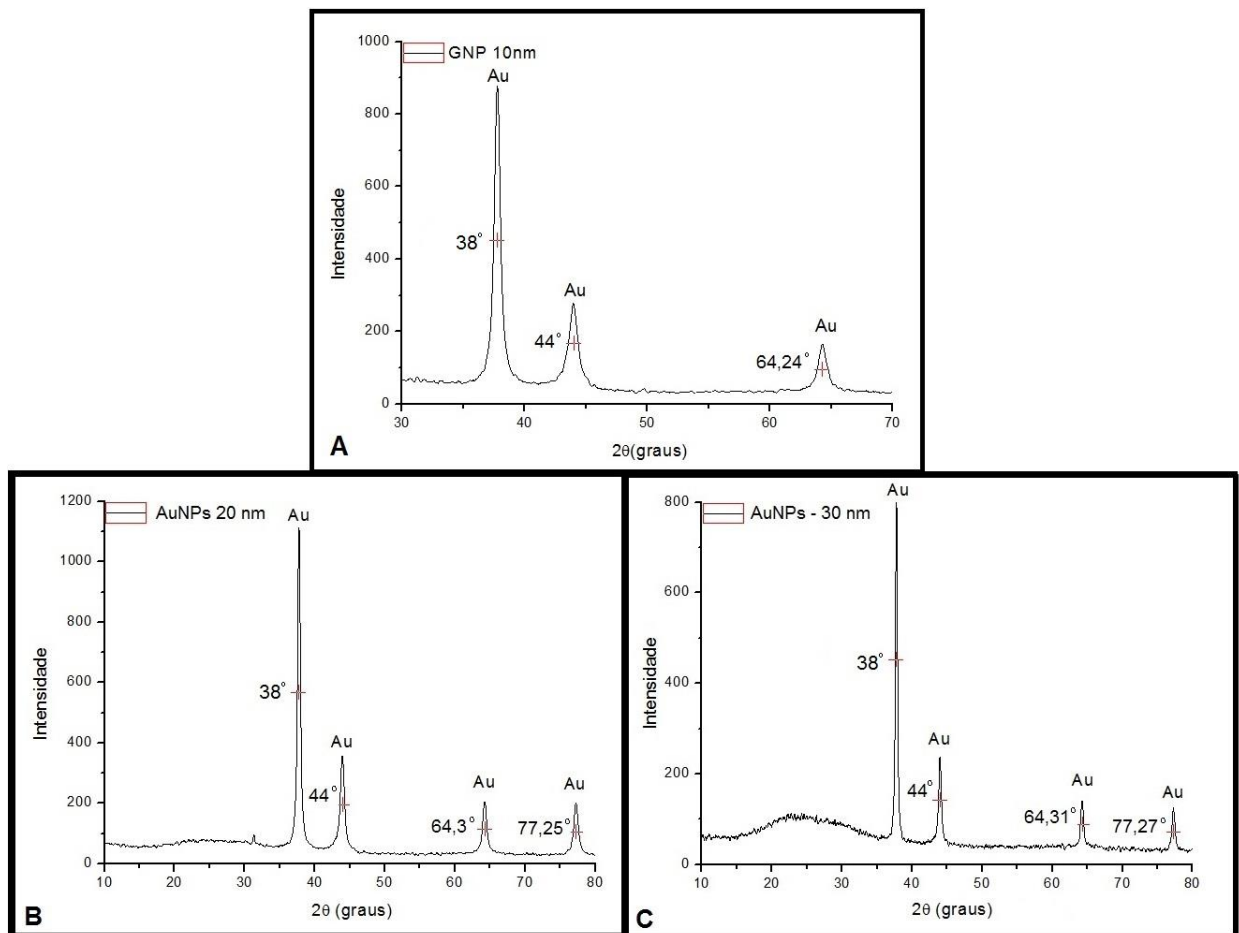
A figura 11 corresponde aos espectros eletrônicos de absorção na região do ultravioleta-visível para as dispersões de AuNPs-10 nm, AuNPs-20 nm e AuNPs-30 nm, e revelam a presença de uma banda de SPR em 521 nm, 528 nm e em 545 nm, respectivamente. Tais resultados corroboram com estudos anteriores que apontam que tais espectros eletrônicos de absorção são característicos de nanopartículas de 10, 20 e 30 nm de formato esférico (Alkilany e Murphy<sup>90</sup> 2010, Philip<sup>110</sup> 2008).



**Figura 11.** Espectros eletrônicos de absorção na região do ultravioleta-visível para as dispersões coloidais de ouro (AuNPs 10, 20 e 30 nm). A) Espectro de 521 nm de absorbância para as AuNPs - 10 nm. B) Espectro de 528 nm de absorbância para as AuNPs - 20 nm. C) Espectro de 545 nm de absorbância para as AuNPs - 30 nm.

Os difratogramas de raios-X apresentados na figura 12 mostram a presença de reflexões próximas a  $38^\circ$ ,  $44^\circ$  e  $64^\circ$  sendo compatíveis com o espectro padrão de ouro metálico, além de evidenciar seu caráter cristalino pela nítida formação dos picos (JCPDS number: 4-0784) (Yan et al.<sup>112</sup> 2005, Singh et al.<sup>124</sup> 2009, Aswathy Aromal e Philip<sup>125</sup> 2012).

A partir dos dados expressos nos difratogramas de raios-X, os diâmetros médios das nanopartículas foram determinados com base na banda com sinal de maior intensidade ( $2\theta = 38^\circ$ ) e empregando a equação de Scherrer (Yan et al.<sup>112</sup> 2005). Os valores obtidos foram de aproximadamente 10, 20 e 30 nm, conforme esperado (Link e El-Sayed<sup>126</sup> 1999, Chen et al.<sup>127</sup> 2005).



**Figura 12.** Difratograma com padrão de DRX das AuNPs de 10, 20 e 30 nm. A) Padrão de DRX das AuNPs-10 nm com reflexões a  $38^\circ$ ,  $44^\circ$  e  $64,24^\circ$ . B) Padrão de DRX das AuNPs-20 nm com reflexões  $38^\circ$ ,  $44^\circ$ ,  $64,3^\circ$  e  $77,25^\circ$ . C) Padrão de DRX das AuNPs-30 nm com reflexões a  $38^\circ$ ,  $44^\circ$ ,  $64,31^\circ$  e  $77,27^\circ$ . Cu K $\alpha$  radiação ( $\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$ , 30 kV, 30 mA). Velocidade de varredura  $2^\circ/\text{min}$ .

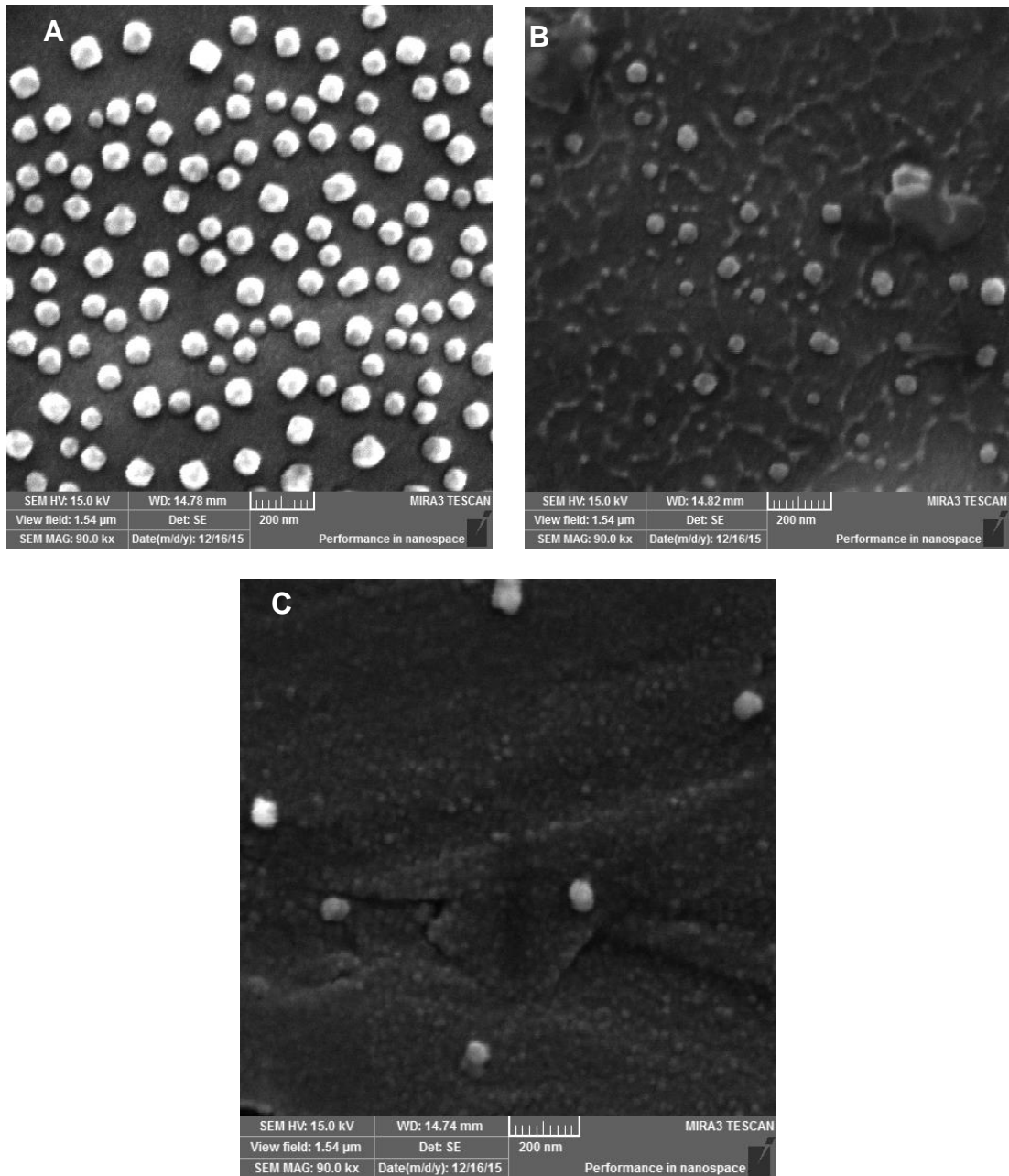
O teor de ouro nas dispersões de AuNPs foi determinado por espectroscopia de absorção atômica obtendo concentração de 70 mg/L para as 3 dispersões de AuNPs. A partir dessa concentração foram realizadas as diluições em água destilada estéril para as concentrações de tratamento utilizadas no experimento de modo que após serem adicionadas aos poços de cultura celular adquirissem as concentrações de: 1,25; 5; 15 e 35 mg/L.

As medidas de potencial zeta demonstraram o perfil aniônico das dispersões coloidais de AuNPs, determinando os valores de -32,5 mV, -34,4mV e -35 mV para dispersões de AuNPs de 10, 20 e 30 nm respectivamente. Esses dados indicam um menor potencial de toxicidade das dispersões coloidais pela sua carga aniônica, visto que partículas com perfil catiônico podem interferir na capacidade de atravessar membranas celulares carregadas negativamente e provocar danos celulares por provocar o rompimento de membrana celular (Clogston e Patri<sup>114</sup> 2011, Wu et al.<sup>115</sup> 2011).

**Tabela 1.** Medidas do potencial Zeta das dispersões de AuNPs nos diâmetros de 10, 20 e 30 nm expressos em mV.

<b>Amostra</b>	<b>Potencial Zeta (mV)</b>
<b>AuNPs 10 nm</b>	-32,5
<b>AuNPs 20 nm</b>	-34,4
<b>AuNPs 30 nm</b>	-35

A caracterização morfológica das AuNPs de diferentes diâmetros foi realizada através de imagens obtidas por Microscopia eletrônica de varredura por canhão de emissão de campo elétrico (FEG), buscando verificar se as AuNPs preservavam seu formato esférico como proposto pelo método de síntese. É possível verificar nas imagens o padrão esférico das nanopartículas nos 3 diâmetros testados (figura 13). Nas capturas de imagem obtidas pelo FEG as nanopartículas se apresentam de maior diâmetro devido ao processo de metalização realizado para proporcionar melhor nitidez às imagens, desta forma, não podendo ser determinado o diâmetro das nanopartículas.

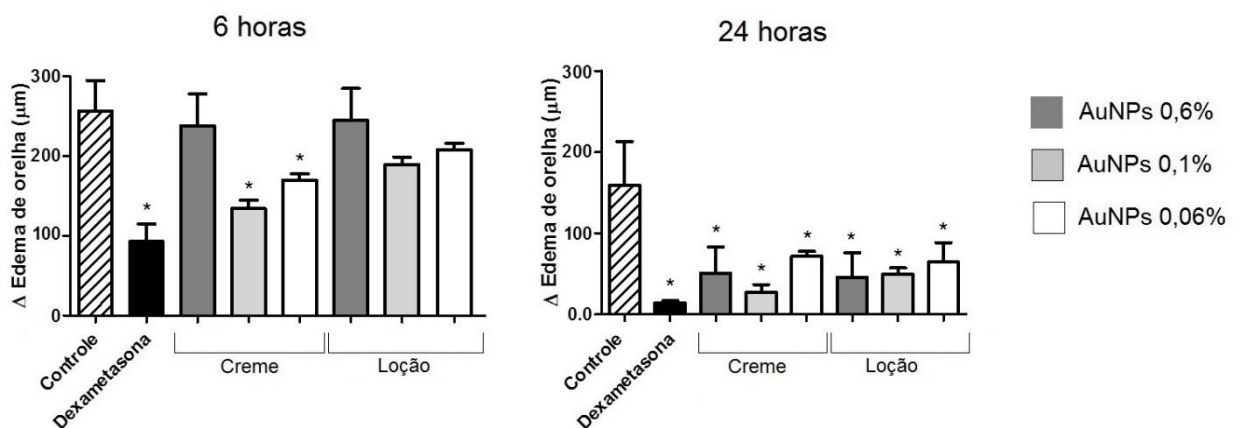


**Figura 13.** Formato esférico das AuNPS representado através de Microscopia Eletrônica de Varredura por canhão de emissão de campo elétrico. A) AuNPs-10 nm. B) AuNPs-20 nm. C) AuNPs-30 nm.

Os testes empregados no procedimento de caracterização das AuNPs foram fundamentais para assegurar que as dispersões coloidais de AuNPs usadas neste estudo apresentaram sempre as mesmas propriedades e dimensões, tornando-as, desta forma, aptas para serem utilizadas no estudo proposto.

## 5.2. Aplicação tópica de formulações de AuNPs em modelo animal de edema de orelha induzido por TPA

Para análise do possível mecanismo de ação das AuNPs a partir de uma aplicação tópica, foram utilizadas formulações em creme e em loção contendo AuNPs de 10 nm de diâmetro em modelo de inflamação em orelha induzido pela aplicação tópica de TPA. Como as formulações testadas seriam administradas localmente por aplicação tópica, optou-se pelas nanopartículas de menor diâmetro, pois como descrito na literatura o diâmetro da nanopartícula é um dos fatores determinantes para sua capacidade de penetrar nos tecidos, sendo que geralmente isso ocorre de maneira tamanho dependente, desse modo os nanomateriais de menor diâmetro apresentando maior facilidade (Sperling et al.<sup>7</sup> 2008). Foram testadas as AuNPs nas concentrações de 0,6%, 0,1% e 0,06% em formulações em creme e em loção. Os resultados indicaram que, conforme a figura 14, os grupos tratados com AuNPs em loção não apresentaram redução significativa no edema de orelha no período de 6h, assim como a formulação a 0,6% em creme, apresentando efeito apenas após 24h. Em geral, a formulação em creme a 0,1% apresentou os melhores resultados nos dois períodos avaliados. Após 24h todas as formulações foram capazes de reduzir a formação do edema de orelha, apresentando resultados sem diferença estatística em comparação ao grupo tratado com a dexametasona.



**Figura 14.** Δ do edema de orelha em animais tratados com formulação de AuNPs a 0,06%, 0,1% e 0,6% em creme e loção após 6 horas e 48 horas da indução do edema com TPA. Os dados foram analisados pela análise de variância de uma via (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey quando F foi significativo. Dados expressos em μm (n=5). \* quando p<0,05 em comparação ao grupo controle.

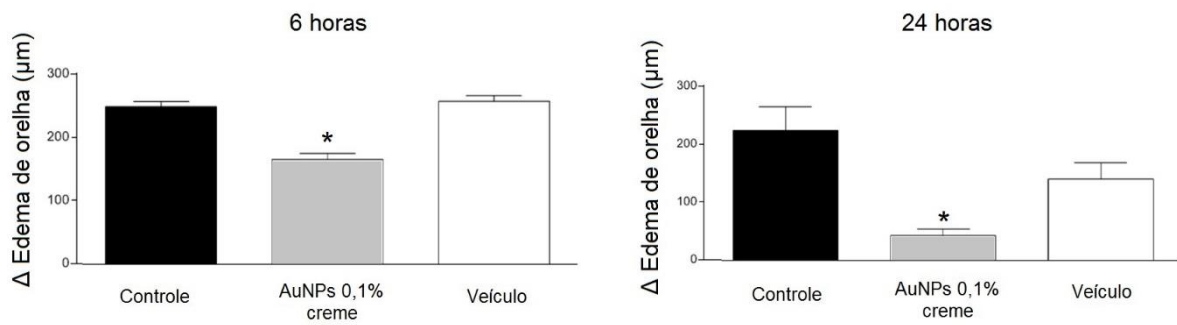


**Tabela 2.** Inibições máximas do edema de orelha obtidas pela aplicação de Dexametasona e formulações em creme e loção de AuNPs a 0,06%, 0,1% e 0,6% após 6h e 24h.

<b>AVALIAÇÃO APÓS 6H</b>	
<b>Formulações</b>	<b>Diminuição do edema de orelha (%)</b>
<b>Dexametasona</b>	64
<b>AuNPs creme 0,1%</b>	48
<b>AuNPs creme 0,06%</b>	34
<b>AVALIAÇÃO APÓS 24H</b>	
<b>Formulações</b>	<b>Diminuição do edema de orelha (%)</b>
<b>Dexametasona</b>	91
<b>AuNPs creme 0,6%</b>	68
<b>AuNPs creme 0,1%</b>	83
<b>AuNPs creme 0,06%</b>	55
<b>AuNPs loção 0,6%</b>	71
<b>AuNPs loção 0,1%</b>	69
<b>AuNPs loção 0,06%</b>	60

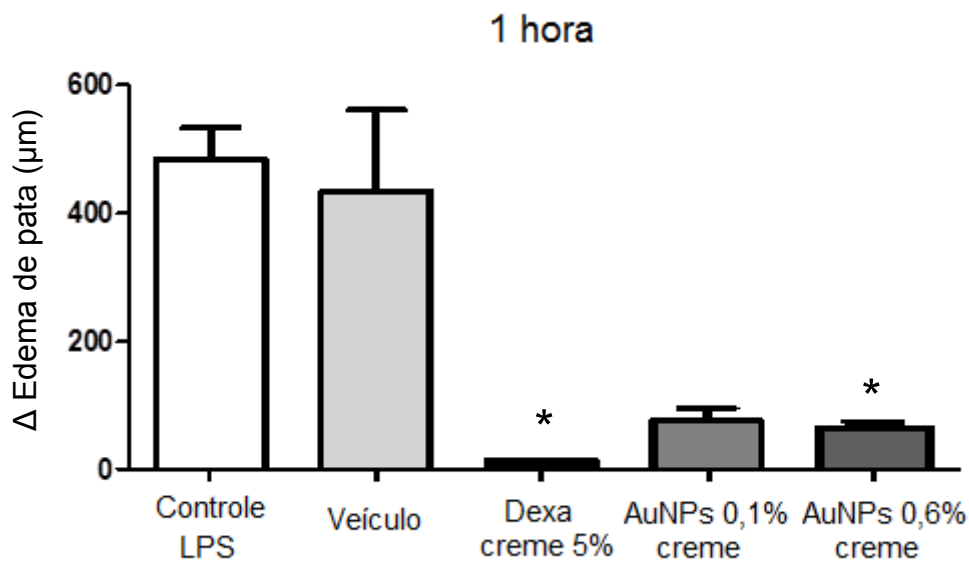
Nota: Descritas apenas as formulações que apresentaram valor de  $p < 0,05$  em comparação com grupo controle (apenas aplicação de TPA) nos respectivos períodos avaliados.

Para descartar a possibilidade de que a diminuição no edema de orelha dos animais teria sido ocasionada pela ação do veículo ao invés da ação das AuNPs, foi realizado outro experimento com 15 animais distribuídos em 3 grupos: o grupo controle (TPA), o grupo que recebeu a formulação de AuNPs a 0,1% em creme (que obteve melhor resultado) e a inclusão de um grupo tratado apenas com creme não iônico utilizado como veículo. Conforme a figura 15, a aplicação do creme não teve interferência no edema de orelha no período de 6 e 24h. Já o tratamento com a formulação de AuNPs a 0,1% em creme confirmou a sua ação na diminuição do edema de orelha como verificado no primeiro experimento.



**Figura 15.** Δ do edema de orelha em animais tratados com formulação em creme de AuNPs 0,1% e creme não iônico (veículo) 6 horas e 24 horas após a indução do edema com TAP. Os dados foram analisados pela análise de variância de uma via (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey quando F foi significativo. Dados expressos em μm (n=5). \* quando  $p < 0,05$  em comparação ao grupo controle.

### 5.3. Aplicação tópica de formulações de AuNPs em modelo animal de edema de pata induzido por LPS



**Figura 16.** Δ do edema de pata em animais tratados com formulação de AuNPs a 0,1% e 0,6% em creme após 1 hora da indução do edema com LPS. Os dados foram analisados pela análise de variância de uma via (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey quando F foi significativo. Dados expressos em μm, média ± E.P.M. (n=5). \* quando  $p < 0,05$  em comparação ao grupo controle.

O experimento mostrou que a aplicação prévia apenas do veículo em creme não foi responsável por diminuir de maneira significativa a formação do edema na pata dos animais. A dexametasona, utilizada como controle positivo, apresentou um forte efeito inibitório na formação do edema. As formulações em creme de AuNPs a 0,1%

e 0,6% também apresentaram efeito na diminuição do edema formado, não apresentando diferença estatística em comparação com os resultados encontrados pela aplicação de dexametasona.

**Tabela 3.** Inibições máximas do edema de pata obtidas pela aplicação de Dexametasona e formulações em creme de AuNPs a 0,1% e 0,6%.

<b>AVALIAÇÃO APÓS 1H</b>	
<b>Formulações</b>	<b>Diminuição do edema de pata (%)</b>
<b>Dexametasona</b>	97
<b>AuNPs creme 0,1%</b>	84
<b>AuNPs creme 0,6%</b>	87

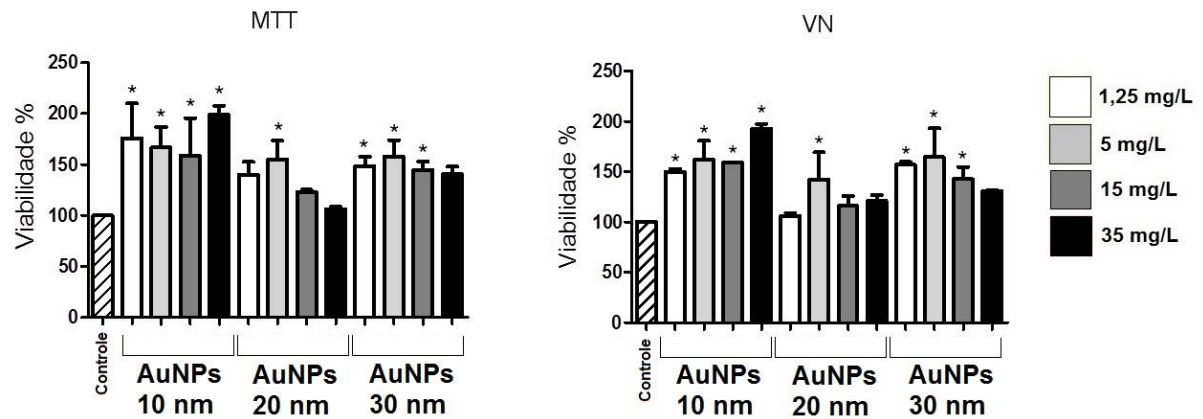
Nota: Descritas apenas as formulações que apresentaram valor de  $p < 0,05$  em comparação com grupo controle (apenas aplicação de LPS) na avaliação após 1 hora.

#### **5.4. Viabilidade celular de fibroblastos e macrófagos**

##### **5.4.1. Viabilidade celular de fibroblastos 3T3 por MTT, Vermelho Neutro e Azul de Tripan**

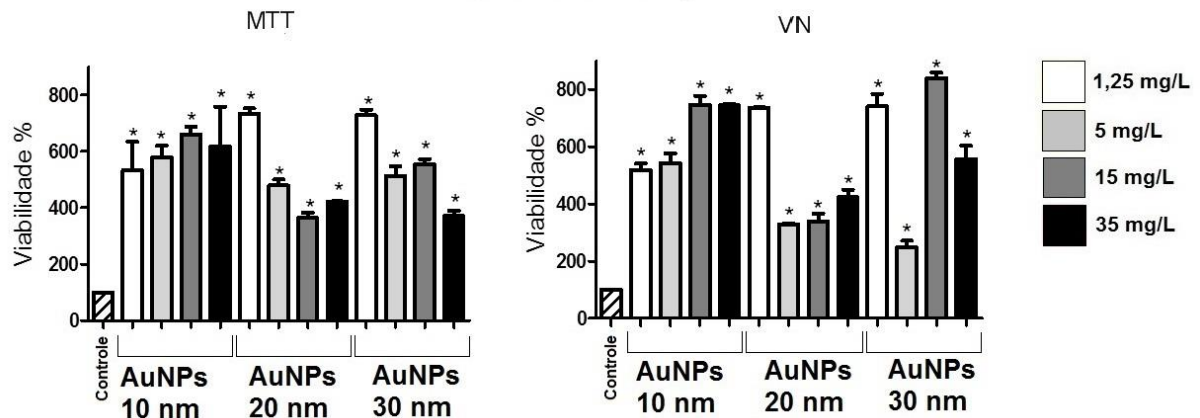
Inicialmente foi analisado o potencial de citotoxicidade dos 3 diâmetros de AuNPs nas concentrações de 1,25; 5; 15 e 35 mg/L em 12, 24 e 48 h em fibroblastos 3T3 através dos ensaios de Thyazolyl blue tetrazoliumbromide (MTT) e Vermelho Neutro (VN).

### 12 Horas de Incubação

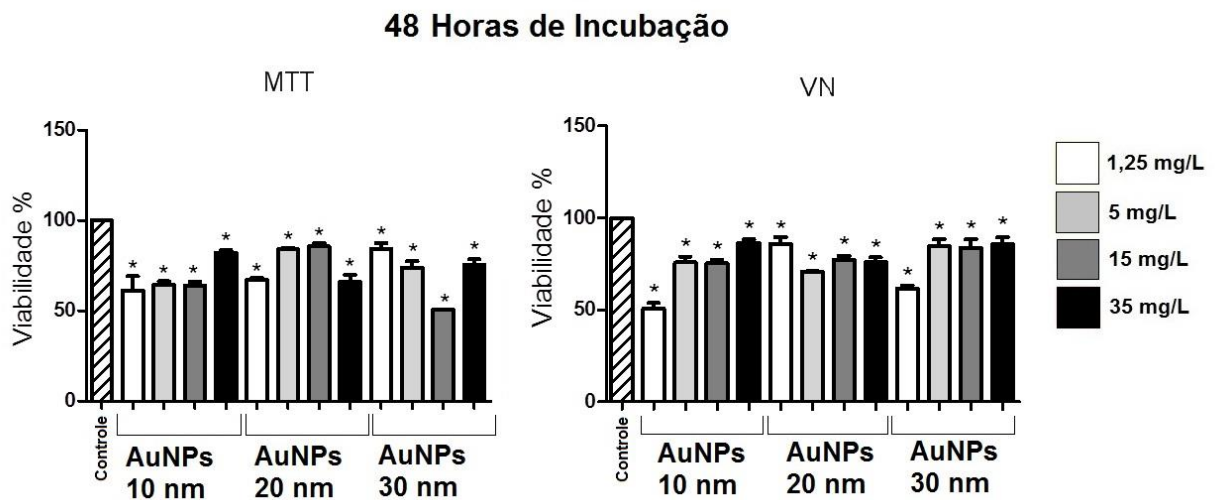


**Figura 17.** Viabilidade celular de fibroblastos 3T3 pelo método do MTT e Vermelho Neutro no período de 12 horas de incubação com os AuNPs de 10, 20 e 30 nm nas concentrações de 1,25; 5; 15 e 35 mg/L. Os dados foram analisados pela análise de variância de uma via (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey quando F foi significativo. Dados expressos em média da % de Viabilidade celular (n=9). \* quando  $p < 0,05$  em comparação ao grupo controle.

### 24 Horas de Incubação



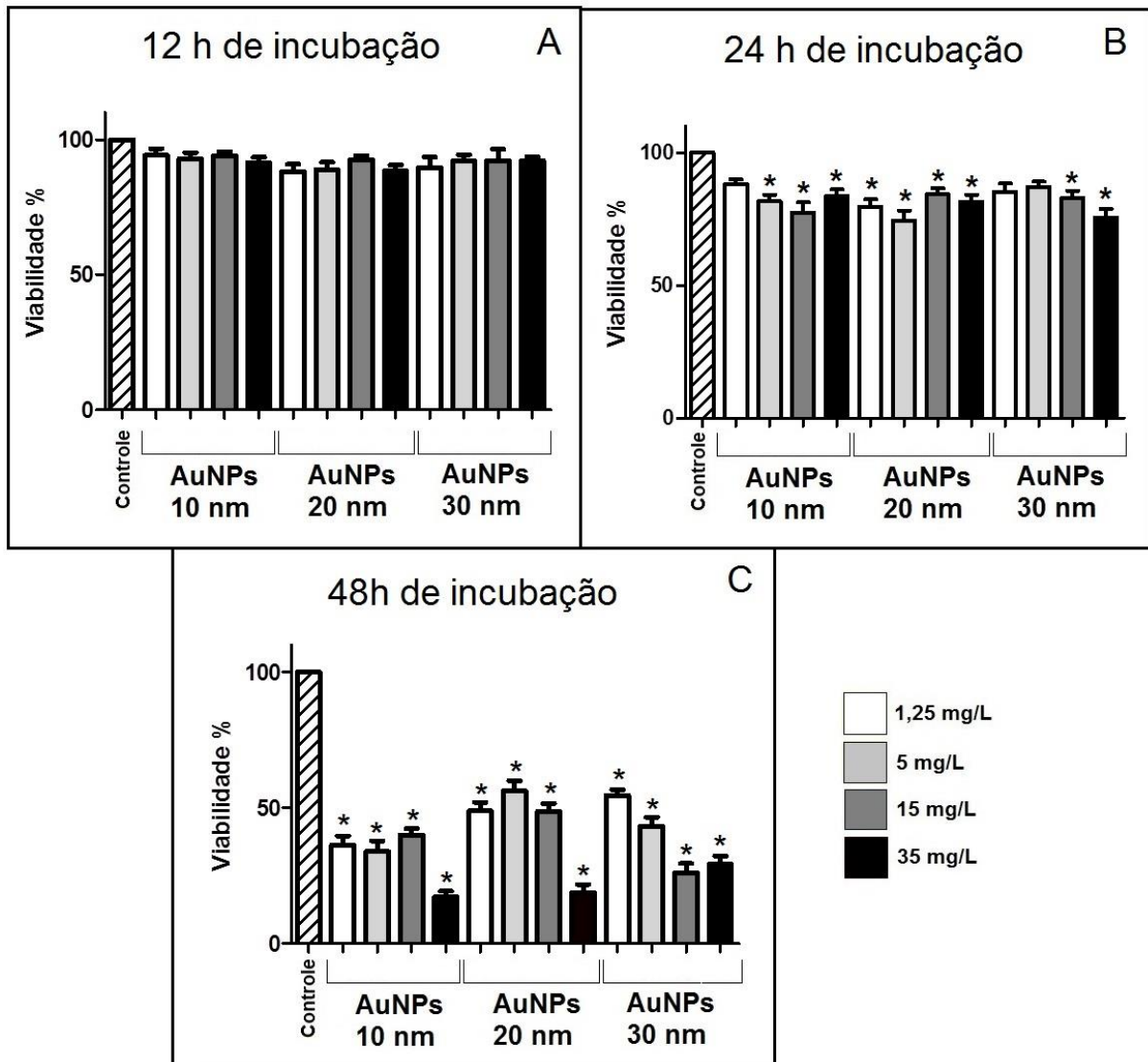
**Figura 18.** Viabilidade celular de fibroblastos 3T3 pelo método do MTT e VN no período de 24 horas de incubação com os AuNPs de 10, 20 e 30 nm nas concentrações de 1,25; 5; 15 e 35 mg/L. Os dados foram analisados pela análise de variância de uma via (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey quando F foi significativo. Dados expressos em média da % de Viabilidade celular (n=9). \* quando  $p < 0,05$  em comparação ao grupo controle.



**Figura 19.** Viabilidade celular de fibroblastos 3T3 pelo método do MTT e VN no período de 48 horas de incubação com os AuNPs de 10, 20 e 30 nm nas concentrações de 1,25; 5; 15 e 35 mg/L. Os dados foram analisados pela análise de variância de uma via (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey quando F foi significativo. Dados expressos em média da % de Viabilidade celular (n=9). \* quando  $p < 0,05$  em comparação ao grupo controle.

Os testes de viabilidade pela metodologia do MTT e do Vermelho Neutro indicaram resultados parcialmente semelhantes mostrando um aumento na viabilidade celular dos fibroblastos após 12h em contato com as dispersões de AuNPs (Figura 17), apresentando valores ainda mais elevados após 24h de tratamento (Figura 18), seguido de uma queda abrupta no período de 48h indicando uma ação citotóxica nesse período (Figura 19).

O aumento exagerado da viabilidade celular, especialmente após 24h de incubação dos fibroblastos com as AuNPs, verificado pelos testes colorimétricos do MTT e Vermelho Neutro, não reproduziu verdadeiramente a viabilidade dos fibroblastos. Visto a inconsistência dos dados obtidos pelas duas metodologias, foi necessária a aplicação de outro método para análise de viabilidade celular. Foi escolhido o teste de exclusão do azul de Tripán pela simplicidade da técnica e confiabilidade dos dados, visto que não dependem de análise colorimétrica por espectrofotometria como os outros dois métodos já aplicados.



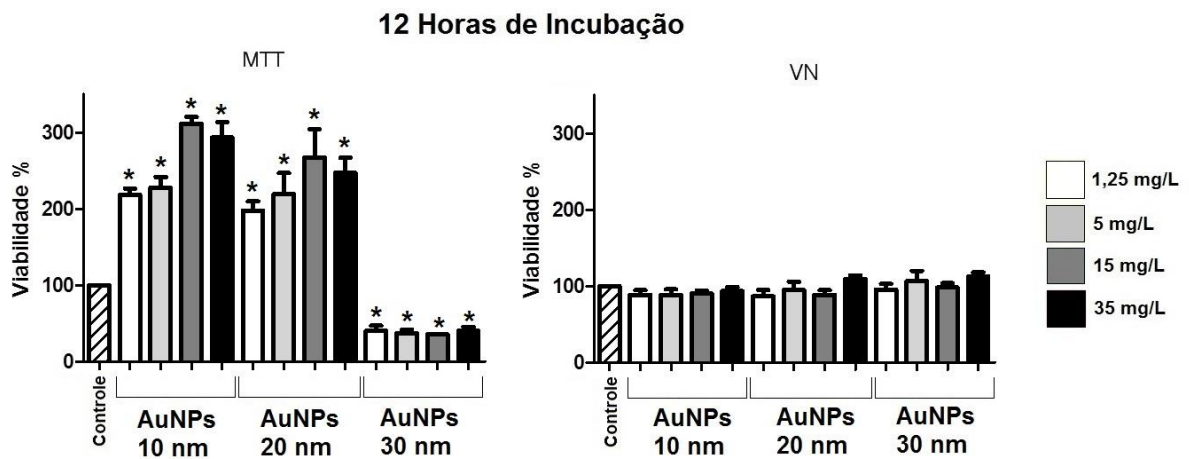
**Figura 20.** Viabilidade celular de fibroblastos 3T3 pelo teste de exclusão do azul de tripan no período de: A) 12 horas, B) 24 horas e C) 48 horas de incubação com as AuNPs de 10, 20 e 30 nm nas concentrações de 1,25; 5; 15 e 35 mg/L. Os dados foram analisados pela análise de variância de uma via (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey quando F foi significativo. Dados expressos em média da % de Viabilidade celular (n=8). \* quando  $p < 0,05$  em comparação ao grupo controle.

O teste de exclusão do azul de Tripan indicou uma ausência de alteração na viabilidade celular dos fibroblastos após 12h de incubação das células com as dispersões de AuNPs em qualquer diâmetro e concentração testada (Figura 20A). Após 24h de incubação das células com os tratamentos, ocorreu uma diminuição na viabilidade dos macrófagos em todos os poços exceto nos poços tratados com as AuNPs de 10 nm na concentração de 1,25 mg/mL e com as AuNPs de 30 nm nas concentrações de 1,25 mg/mL e 5 mg/mL (Figura 20B). Após 48h essa diminuição da

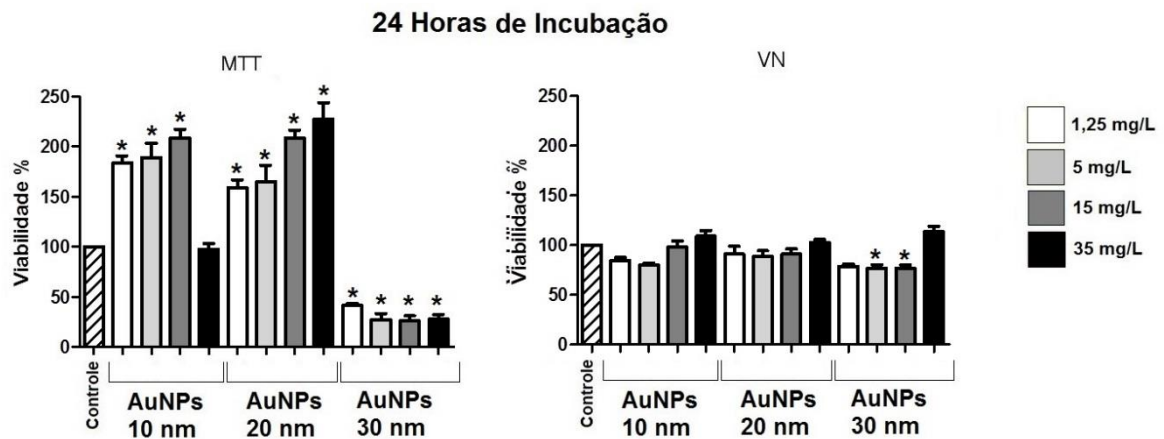
viabilidade celular se acentuou, sendo mais expressiva nos poços tratados com as AuNPs de 10, 20 e 30 nm na maior concentração (figura 20C).

#### 5.4.3. Viabilidade celular de macrófagos RAW 264.7 por MTT, Vermelho Neutro e Azul de Trypan

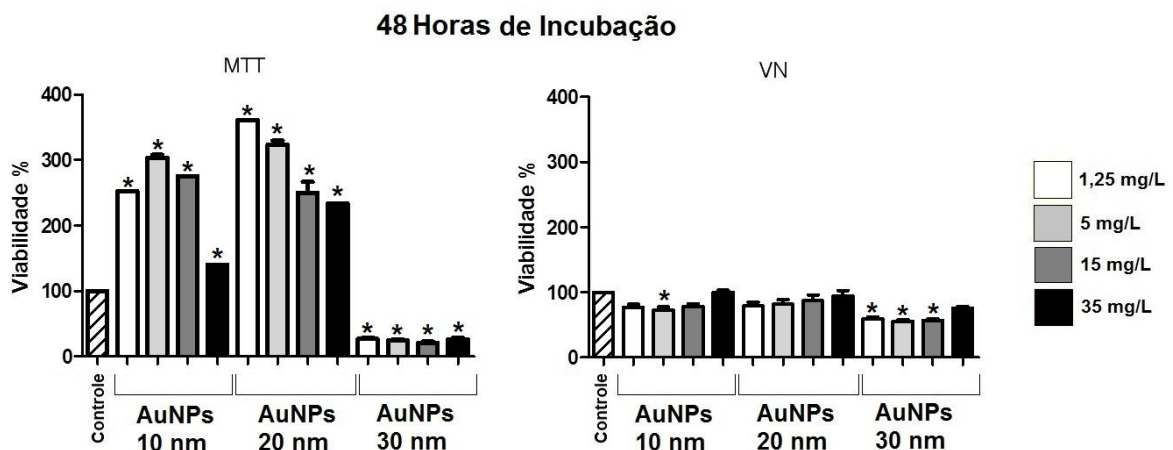
Inicialmente foi analisado o potencial de citotoxicidade dos 3 diâmetros de AuNPs nas concentrações de 1,25; 5; 15 e 35 mg/L em 12, 24 e 48 h em macrófagos RAW 264.3 através dos ensaios de Thyazolyl blue tetrazoliumbromide (MTT) e Vermelho Neutro (VN).



**Figura 21.** Viabilidade celular de macrófagos RAW 264.7 pelo método do MTT e VN no período de 12 horas de incubação com os AuNPs de 10, 20 e 30 nm nas concentrações de 1,25; 5; 15 e 35 mg/L. Os dados foram analisados pela análise de variância de uma via (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey quando F foi significativo. Dados expressos em média da % de Viabilidade celular (n=9). \* quando  $p < 0,05$  em comparação ao grupo controle.



**Figura 22.** Viabilidade celular de macrófagos RAW 264.7 pelo método do MTT e VN no período de 24 horas de incubação com os AuNPs de 10, 20 e 30 nm nas concentrações de 1,25; 5; 15 e 35 mg/L. Os dados foram analisados pela análise de variância de uma via (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey quando F foi significativo. Dados expressos em média da % de Viabilidade celular (n=9). \* quando  $p < 0,05$  em comparação ao grupo controle.



**Figura 23.** Viabilidade celular de macrófagos RAW 264.7 pelo método do MTT e VN no período de 48 horas de incubação com os AuNPs de 10, 20 e 30 nm nas concentrações de 1,25; 5; 15 e 35 mg/L. Os dados foram analisados pela análise de variância de uma via (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey quando F foi significativo. Dados expressos em média da % de Viabilidade celular (n=9). \* quando  $p < 0,05$  em comparação ao grupo controle.

O teste de viabilidade celular a partir do VN mostrou uma manutenção da viabilidade celular dos macrófagos nos períodos de 12 e 24h, ocorrendo uma pequena redução apenas no período de 48h sendo mais expressivo para os tratamentos com as AuNPs de 30 nm.



O ensaio de MTT apresentou dados contrastantes aos indicados pelo Vermelho Neutro, onde as dispersões de AuNPs de 10 e 20 nm apresentaram um aumento expressivo na viabilidade celular nos 3 períodos avaliados.

A fim de verificar se os tratamentos interferiam na formação de cristais de formazan, mesmo na ausência de células, foi realizado um experimento em placa de 96 poços separada, onde os poços receberam apenas as dispersões de tratamento sem incubação prévia com suspensão de células. Transcorridas 24h foi então realizada a aplicação da dispersão do MTT nos poços e incubados por 3h. Após o tempo de incubação o sobrenadante foi descartado e aplicado etanol para solubilização dos cristais de formazan a partir da redução do MTT. O teste indicou que as dispersões de tratamento de AuNPs, principalmente as de 10 e 20 nm, foram capazes de estimular a conversão do MTT para os cristais de formazan em todas as concentrações testadas mesmo na ausência de células. Em seguida foi realizada leitura da placa em espectrofotômetro a 570 nm para então obter os valores de absorbância.

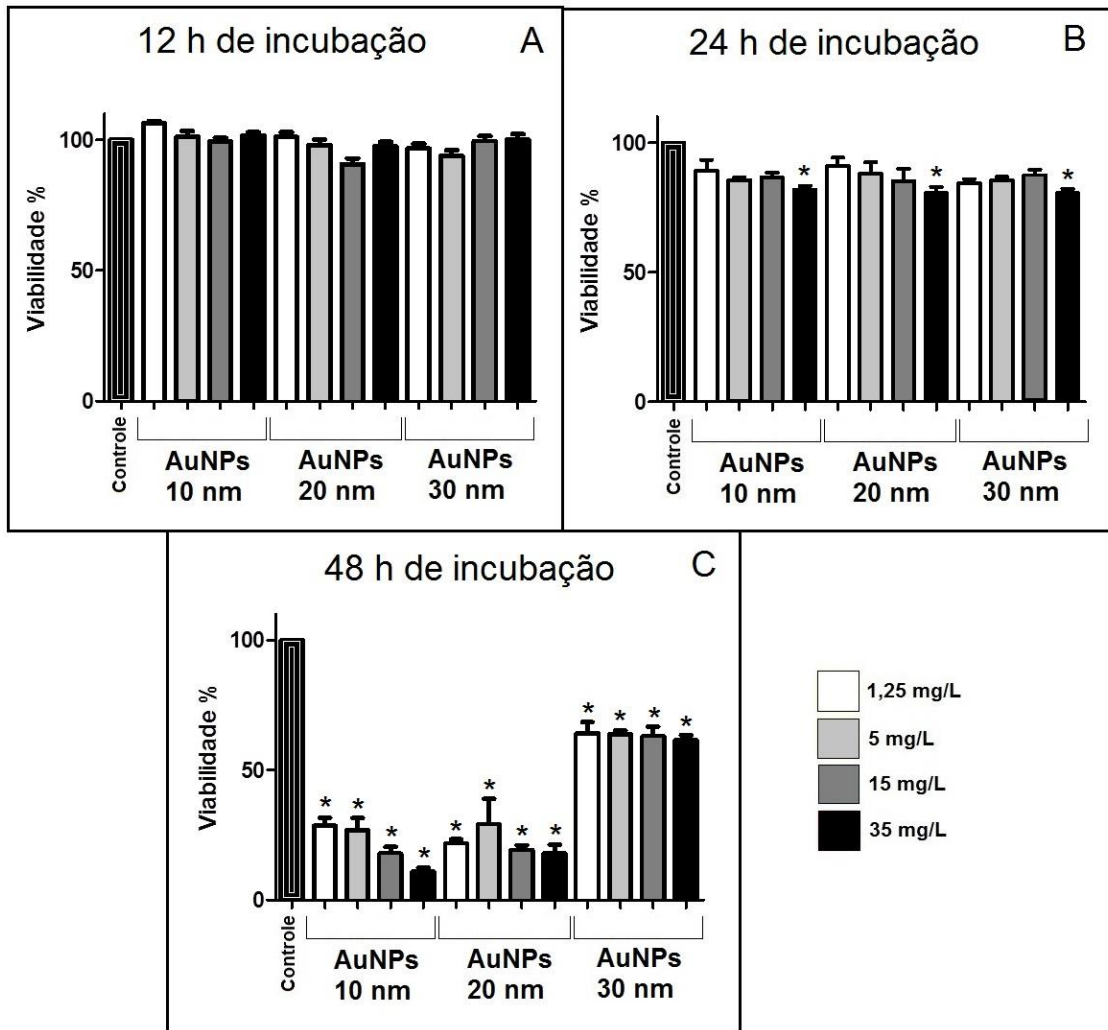
Os valores de absorbância foram então descontados dos valores das leituras dos experimentos com células, porém as taxas de viabilidade permaneceram elevadas, o que não foi confirmado através de análise das placas no microscópio invertido.

Podemos afirmar que os testes de viabilidade celular realizados empregando as metodologias do MTT e VN não foram capazes de refletir a viabilidade das células após os tratamentos com diferentes diâmetros e concentrações de AuNPs. Sendo assim, fez-se necessário a realização de mais testes para verificar viabilidade celular com o tratamento de AuNPs com um método diferente.

Outro teste foi realizado para analisar a viabilidade das células após o tratamento com as AuNPs com o método de exclusão do azul de tripan.

A viabilidade celular dos poços controle foi considerada como 100%. Todos os diâmetros e concentrações das AuNPs não apresentaram efeitos citotóxicos em macrófagos no período de 12h, não apresentando diferença estatística da viabilidade celular apresentada no grupo controle. Em 24h os macrófagos se apresentaram menos vulneráveis a danos pelas AuNPs em comparação aos fibroblastos. Com 24 h de incubação das células com as AuNPs as porcentagens de viabilidade dos

macrófagos sofreram uma leve redução, sendo significativa apenas nos poços tratados com as dispersões de AuNPs dos 3 diâmetros utilizados na maior concentração. Em 48h todas as concentrações testadas de todos os diâmetros de nanopartículas de ouro apresentaram-se citotóxicas, com acentuada redução na viabilidade dos macrófagos.



**Figura 24.** Viabilidade celular de macrófagos RAW 264.7 pelo teste de exclusão do azul de tripan no período de: A) 12 horas, B) 24 horas e C) 48 horas de incubação com os AuNPs de 10, 20 e 30 nm nas concentrações de 1,25; 5; 15 e 35 mg/L. Os dados foram analisados pela análise de variância de uma via (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey quando F foi significativo. Dados expressos em média da % de Viabilidade celular (n=8). \* quando  $p < 0,05$  em comparação ao grupo controle.

## 6. DISCUSSÃO

### Testes de caracterização

Os resultados da espectroscopia de Uv-Vis corroboram com estudos anteriores, indicando que os espectros de absorção condizem com nanopartículas esféricas com diâmetros de 10, 20 e 30 nm. Tais resultados corroboram com o indicado pela literatura, sendo que os espectros eletrônicos e, conseqüentemente, as colorações das dispersões coloidais de AuNPs dependem da geometria e tamanho das partículas, visto que a coloração resulta da interação dos elétrons das superfícies das nanopartículas com a luz incidente (Alkilany e Murphy<sup>90</sup> 2010, Philip<sup>110</sup> 2008).

Os ângulos de reflexão apresentados nos difratogramas de raios-X são compatíveis com o espectro padrão de ouro metálico apresentados em estudos anteriores, além de evidenciar seu caráter cristalino (JCPDS number: 4-0784) (Yan et al.<sup>112</sup> 2005, Singh et al.<sup>124</sup> 2009, Aswathy Aromal e Philip<sup>125</sup> 2012). A partir dos valores da banda com sinal de maior intensidade ( $2\theta = 38^\circ$ ) foi possível verificar o diâmetro médio das AuNPs através do emprego da equação de Scherrer (Yan et al.<sup>112</sup> 2005), corroborando com os diâmetros indicados pela espectroscopia de UV-Vis. Pode-se verificar que no DRX, com o aumento do tamanho das partículas a banda de SPR característica torna-se mais larga e desloca-se em direção ao vermelho, e os picos de DRX tornam-se mais estreitos (Link e El-Sayed<sup>126</sup> 1999, Chen et al.<sup>127</sup> 2005).

Quase todos os materiais particulados em contato com um líquido adquirem uma carga elétrica em sua superfície, aparecendo devido a dissociação de grupos ionogênicos na superfície da partícula e pela adsorção diferencial de íons da solução na superfície da partícula. Forma-se uma dupla camada elétrica na interface da partícula com o líquido. O potencial zeta é função da carga superficial da partícula, de qualquer camada adsorvida na interface com o meio e da natureza e composição do meio que a circunda. Esse potencial pode ser determinado experimentalmente refletindo a carga efetiva nas partículas, se correlacionando com a repulsão eletrostática entre elas e com a estabilidade da solução, deste modo, sendo um indicador útil da carga de superfície, podendo ser usado para prever e controlar a estabilidade de soluções ou dispersões coloidais. Quanto maior o potencial zeta

(catiônico ou aniônico), mais provável que a solução seja estável, pois as partículas carregadas se repelem umas às outras e essa força supera a tendência natural à agregação (Martins<sup>113</sup> 2007).

Nanopartículas que apresentam potencial zeta entre -10 e +10 mV são consideradas aproximadamente neutras, enquanto são consideradas fortemente catiônicas nanopartículas com potencial zeta superior a +30 mV e fortemente aniônicas as com potencial zeta inferior a -30 mV. Como a membrana celular da maioria das células são carregadas negativamente, o potencial zeta das nanopartículas pode interferir na sua tendência de permear membranas, sendo que partículas catiônicas geralmente apresentam mais toxicidade associada com rompimento de membrana celular (Clogston e Patri<sup>114</sup> 2011, Wu et al.<sup>115</sup> 2011). Desta forma, os valores aniônicos verificados nas dispersões coloidais de AuNPs evidenciam sua menor chance de toxicidade, além de demonstrar sua estabilidade.

Na caracterização morfológica, as imagens do FEG demonstraram o padrão esférico das AuNPs, corroborando com o proposto pela metodologia de síntese, bem como com os resultados da espectroscopia Uv-Vis. Porém, como foi necessário submeter as amostras ao processo de metalização para melhor definição das imagens no FEG, o procedimento de análise composicional (EDS) e mensuração do diâmetro das amostras não puderam ser realizados. Ainda é necessário buscar uma metodologia adequada quanto ao processamento das AuNPs para análise por FEG que não dependa do procedimento de metalização para se obter imagens nítidas em elevadas ampliações.

### Experimentos *in vivo*

Como as AuNPs são sintetizadas em meio líquido no momento em que eram incorporadas nas formulações, as mesmas adquiriam consistência mais líquida. Nas formulações de AuNPs em loção essa característica foi mais acentuada, podendo ter influenciado na permanência do composto no local aplicado, no modelo de edema de orelha induzido por TPA, e conseqüentemente interferido nos resultados, especialmente na avaliação de 6h.

O TPA atua estimulando a formação de metabólitos do ácido araquidônico, após ser metabolizado pelas vias enzimáticas da ciclooxigenase e lipooxigenase (Young et al.<sup>116</sup> 1983). Visto que a ativação do NF-κB pode regular a transcrição da COX-2 (Lee et al.<sup>117</sup> 2004), e as AuNPs podem atuar inibindo a ativação dessa via (Jeon et al.<sup>8</sup> 2003), os resultados apresentados no modelo animal de edema de orelha induzido por TPA podem indicar que o tratamento com as AuNPs pode ter de fato interferido nessa ativação do NF-κB, minimizando a expressão da COX-2 a nível de transcrição levando a diminuição da formação dos metabólitos do ácido araquidônico responsáveis pela formação do edema.

No modelo de edema de pata induzido pela aplicação de LPS, os resultados obtidos indicam que a aplicação tópica de AuNPs apresenta efeito anti-inflamatório diante de um quadro localizado de inflamação com componente bacteriano, semelhante à resposta inflamatória que ocorre na doença periodontal.

O LPS atua no organismo ativando a resposta imune inata através do seu reconhecimento pelo TLR-4. A ligação do LPS com seu receptor levará à ativação de vias de sinalização intracelular como a via do NF-κB, permitindo sua migração ao núcleo que irá desencadear a transcrição de RNAm para posterior produção de citocinas e mediadores inflamatórios como TNF-α e IL-1β (Abbas et al.<sup>15</sup> 2012). Na doença periodontal, a presença contínua de bactérias gram-negativas de modo a estimular de maneira constante a resposta imune através do TLRs, é responsável por manter o tecido em uma condição inflamatória crônica (Hans e Hans<sup>12</sup> 2011). Estudos prévios demonstram a capacidade das AuNPs em inibir a ativação do NF-κB, e consequente diminuição da produção de mediadores responsáveis pela manutenção da inflamação (Jeon et al.<sup>8</sup> 2003, Norton<sup>82</sup> 2008, Bondeson e Sundler<sup>93</sup> 1995). Deste modo, o modelo utilizado de edema de pata induzido por LPS permite verificar a capacidade das AuNPs de interferir nesse processo através de sua aplicação tópica, visto seu mecanismo de ação proposto pela literatura.

A avaliação da aplicação tópica de formulações AuNPs é interessante por poder avaliar de forma *in vivo* a toxicidade e a resposta do organismo à administração das AuNPs, pois até mesmo materiais inertes como o ouro podem demonstrar efeitos inflamatórios quando aplicados em tecidos na forma particulada (Sperling et al.<sup>7</sup> 2008).

Em geral, nos testes *in vivo* as formulações em creme e loção de AuNPs demonstraram resultados promissores a respeito de sua administração tópica para

modulação da resposta frente a um estímulo inflamatório, nesse caso induzidos pelo TPA e pelo LPS.

Visto que a administração local de compostos é interessante para o tratamento e controle de condições inflamatórias bucais por ser uma provável via de administração de medicamentos nesse caso, os resultados demonstram a possibilidade do emprego das AuNPs para essa função. Desta forma seria de grande interesse a realização de estudos acerca da administração local de formulações de AuNPs em modelos mais específicos como a doença periodontal e inflamação do tecido pulpar, buscando verificar a reprodutibilidade da capacidade de modulação da resposta inflamatória nesses modelos.

#### Experimentos *in vitro* de citotoxicidade

Os efeitos citotóxicos de nanopartículas devem ser considerados por dois aspectos: toxicidade em relação a natureza do material utilizado (no caso o ouro), e efeitos tóxicos relacionados a forma nanoparticulada de materiais inertes (Sperling et al.<sup>7</sup> 2008, Albrecht et al.<sup>128</sup> 2006).

Apesar das nanopartículas de ouro serem compostas por materiais inertes e não terem sido documentados problemas de biocompatibilidade até a data (Connor et al.<sup>129</sup> 2005), os testes de toxicidade são necessários. Alguns efeitos tóxicos das nanopartículas de ouro estão relacionados com a natureza do Au, a linhagem celular em que é testada, a química de superfície e o tamanho das nanopartículas (Sperling et al.<sup>7</sup> 2008). Os testes de biocompatibilidade devem ser levados em conta, pois as células expostas incorporam as nanopartículas de ouro ficando partículas internalizadas em compartimentos perinucleares e estruturas vesiculares perto do núcleo (Chithrani et al.<sup>130</sup> 2006, Patra et al.<sup>131</sup> 2007), fazendo com que as células estejam expostas a seus efeitos por períodos prolongados (Sperling et al.<sup>7</sup> 2008).

Os resultados do MTT e vermelho neutro apresentaram-se contrastantes em geral, indicando que os testes de viabilidade celular realizados empregando tais métodos não foram capazes de refletir a viabilidade das células após o tratamento com as AuNPs.

A partir da interpretação dos resultados de viabilidade celular elevados no teste do MTT várias possibilidades podem ser verificadas. Uma das possíveis interpretações seria a de que as AuNPs, de 10, 20 e 30 nm nos fibroblastos, e de 10 e 20 nm nos macrófagos, estariam efetivamente estimulando a proliferação celular. Porém as AuNPs poderiam ter sido capazes de estimular as células interferindo na sua atividade mitocondrial, o que também refletiria no aumento da atividade de enzimas mitocondriais avaliadas pelo MTT. Ou ainda, as dispersões coloidais de tratamento com AuNPS poderiam ser capazes de, por si só, estimular a redução do MTT e levar à formação dos cristais de formazan, independente da presença de células.

Em teste realizado a parte, os resultados indicaram que as dispersões coloidais de AuNPs, principalmente as de 10 e 20 nm, foram capazes de estimular a conversão do MTT aos cristais de formazan em todas as concentrações testadas, mesmo na ausência de células, sendo realizada a medição dos valores de absorbância. Porém, mesmo após considerar-se tal fato e descontar-se dos valores de absorbância dos testes, os resultados ainda indicavam altos valores de viabilidade celular, o que não era verdadeiro.

Como as AuNPs tem capacidade de penetração celular, pode-se suspeitar que as AuNPs conseguiram penetrar no interior dos macrófagos (10 e 20 nm) e fibroblastos (10, 20 e 30 nm), fazendo com que os cristais de formazan formados pela ação das AuNPs e das enzimas mitocondriais fossem solubilizados em conjunto após o rompimento das membranas com a aplicação do etanol. Para verificar como se dá a relação entre as nanopartículas e as células, seria importante realizar análises por Microscopia Eletrônica de Transmissão de amostras biológicas de cultura celular tratadas com dispersões de AuNPs a fim de verificar se as nanopartículas se encontram intra ou extracelularmente.

Sabe-se que as nanopartículas de ouro podem se apresentar tóxicas por fatores bióticos, pela interação com a membrana celular, e abióticos, devido a suas propriedades físicas e químicas e seus íons solúveis. Isso se torna possível pelo seu pequeno tamanho e elevada área superficial, o que proporciona uma elevada reatividade (Siddiqi et al.<sup>74</sup> 2012), podendo atuar e interagir em processos dentro e fora da célula capazes de causar destruição e ruptura da membrana dano oxidativo a proteínas e lipídeos da própria membrana, e, dentro da célula, pode interferir na

atividade da catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx), lipoperoxidação, produção de EROs e dano ao DNA, levando até a morte celular (Cardoso<sup>132</sup> 2014, Lapresta-Fernández et al.<sup>133</sup> 2012).

Deste modo, o conhecimento sobre os mecanismos de atuação e interação das nanopartículas com os tecidos e processos celulares é essencial para compreensão do seu potencial funcional e tóxico, para então possibilitar que esses nanomateriais possam ser estudados em aplicações biológicas e empregados em situações clínicas reais (Hashimoto et al.<sup>80</sup> 2015, Alkilany e Murphy<sup>90</sup> 2010, Sabella et al.<sup>91</sup> 2014, Cardoso<sup>132</sup> 2014).

Por sua vez, os testes realizados para verificar o efeito das dispersões coloidais de AuNPs na viabilidade celular de fibroblastos e macrófagos pelo método de exclusão do azul de tripan, apresentaram resultados confiáveis e condizentes com o que era verificado através de visualização em microscópio invertido. Após 12h de incubação das células com as dispersões de AuNPs nenhuma delas foi capaz de diminuir de maneira significativa estatisticamente a porcentagem de viabilidade celular de fibroblastos e macrófagos. Porém, após 24h de incubação, a maior concentração (35 mg/L) das dispersões de AuNPs nos 3 diâmetros testados reduziu a viabilidade de macrófagos. O mesmo ocorreu com os fibroblastos, os quais obtiveram seus valores de viabilidade celular diminuídos, exceto nos poços tratados com as dispersões de AuNPs de 10 nm na concentração de 1,25 mg/L e de 30 nm nas concentrações de 1,25 mg/L e 5 mg/L. Após 48h de incubação, todas as concentrações e diâmetros testados das dispersões de AuNPs se apresentaram citotóxicas, sendo capazes de diminuir drasticamente as porcentagens de viabilidade celular tanto em fibroblastos quanto em macrófagos. Nos testes com fibroblastos essa característica foi mais marcante nos poços tratados com as dispersões de AuNPs nos 3 diâmetros na maior concentração. Já na cultura de macrófagos essa diminuição da viabilidade celular em 48h não foi tão acentuada nos poços tratados com as dispersões de AuNPs de 30 nm em qualquer uma das concentrações.

A citotoxicidade apresentada por AuNPs tem sido descrita como dependente do seu tamanho e principalmente da dose utilizada (Marangoni<sup>134</sup> 2012). Estudos *in vitro* demonstram que AuNPs de 1,4 nm de diâmetro provocam morte celular por indução de estresse oxidativo e danos mitocondriais (Pan et al.<sup>135</sup> 2009), sendo que AuNPs com diâmetro maior de 3,7 nm dificilmente se apresentam tóxicas (Yen et al.<sup>136</sup>



2009). Geralmente, quanto menor o diâmetro maior o potencial tóxico da partícula, devido a sua maior facilidade de penetrar tecidos e membranas (Oberdorster et al.<sup>73</sup> 2005, Armstrong et al.<sup>76</sup> 2004), além de poder interferir em processos essenciais para a manutenção da homeostase celular (Auffan et al.<sup>77</sup> 2009) devido a sua alta reatividade resultante do pequeno tamanho e elevada área superficial (Siddiqi et al.<sup>74</sup> 2012). O aumento da razão entre a área superficial e o volume resulta em um correspondente aumento na reatividade química (Nalwa<sup>137</sup> 2002). Assim, a produção de novos nanomateriais não consistem apenas na escolha da composição adequada (como o ouro no presente estudo) para determinar suas propriedades e novas funções e utilidades, mas também no controle de seu tamanho e forma, de maneira que as nanopartículas apresentem a superfície, carga e funcionalidade requeridas (Marangoni<sup>134</sup> 2012).

Como complemento dos testes de viabilidade celular, seria interessante verificar de maneira *in vitro* o efeito do tratamento com as AuNPs na proliferação e migração dos fibroblastos, utilizando metodologias como o ensaio do cristal violeta e o ensaio de Scratch. Tais métodos auxiliariam na compreensão da interferência das AuNPs no processo de migração e proliferação celular dos fibroblastos, essenciais para estimular o reparo de feridas, etapa fundamental do reparo tecidual após o tratamento de condições inflamatórias do periodonto (Weinreb e Nemcovsky<sup>107</sup> 2015).

Quanto aos resultados verificados a respeito do efeito do tratamento das AuNPs em macrófagos, também seria essencial a realização de estudos que verifiquem o efeito *in vitro* das AuNPs na proliferação celular, na morfologia dessas células, no *burst* respiratório e no perfil de ativação desses macrófagos após serem expostos às AuNPs. Podem ser utilizadas metodologias como a do cristal violeta para análise da proliferação celular, imunomarcação para verificar a expressão de receptores essenciais para a ativação dos macrófagos (como o CD54), além de ensaios, como o método da redução do Nitroazul de tetrazólio (NBT), que verifiquem a atividade desses macrófagos quanto a produção de NO e espécies reativas de oxigênio, essenciais para a atividade fagocítica dessas células.

## 7. CONCLUSÃO

- Os testes de caracterização indicaram que as nanopartículas de ouro sintetizadas pelo método de redução do ácido tetracloroáurico pelo agente redutor e estabilizante citrato de sódio apresentaram realmente os diâmetros médios de 10, 20 e 30 nm, formato esférico e estáveis quando em dispersão coloidal.

- Nos modelos *in vivo* de inflamação aguda, as formulações em creme e loção de AuNPs demonstraram resultados promissores a respeito de sua administração tópica para modulação da resposta frente a um estímulo inflamatório, nesse caso induzidos pelo TPA e pelo LPS, apresentando resultados próximos aos obtidos pela administração de dexametasona.

- Nos testes *in vitro*, os métodos do MTT e Vermelho Neutro não foram capazes de reproduzir de maneira fiel a viabilidade celular de fibroblastos e macrófagos após a exposição às AuNPs, sendo o teste de exclusão do azul de tripan o método mais adequado. As AuNPs não apresentaram efeitos tóxicos no período de 12h de incubação. Em 24h, a maior concentração (35 mg/L) das dispersões de AuNPs nos 3 diâmetros testados reduziu a viabilidade de macrófagos, e os fibroblastos obtiveram seus valores de viabilidade celular diminuídos pela maioria das dispersões de AuNPs testadas. E por fim, após 48h de incubação, todas as concentrações e diâmetros testados das dispersões de AuNPs foram capazes de diminuir drasticamente as porcentagens de viabilidade celular tanto em fibroblastos quanto em macrófagos, demonstrando seu efeito tóxico após um período prolongado de exposição.

## 8. REFERÊNCIAS

1. Kinane DF, Bartold PM. Clinical relevance of the host responses of periodontitis. *Periodontol 2000*. 2007;43:278-93.
2. Genco RJ, Borgnakke WS. Risk factors for periodontal disease. *Periodontol 2000*. 2013 Jun;62(1):59-94.
3. Carranza FA, Newman MG, Takei H, Klokkevold PR. *Periodontia Clínica*. 11 ed: Elsevier: 2012.
4. Caton J, Ryan ME. Clinical studies on the management of periodontal diseases utilizing subantimicrobial dose doxycycline (SDD). *Pharmacol Res*. 2011 Feb;63(2):114-20.
5. Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal diseases. *Lancet*. 2005 Nov;366(9499):1809-20.
6. Zupancic S, Kocbek P, Baumgartner S, Kristl J. Contribution of Nanotechnology to Improved Treatment of Periodontal Disease. *Curr Pharm Des*. 2015;21(22):3257-71.
7. Sperling RA, Rivera Gil P, Zhang F, Zanella M, Parak WJ. Biological applications of gold nanoparticles. *Chem Soc Rev*. 2008 Sep;37(9):1896-908.
8. Jeon KI, Byun MS, Jue DM. Gold compound auranofin inhibits I $\kappa$ B kinase (IKK) by modifying Cys-179 of IKK $\beta$  subunit. *Exp Mol Med*. 2003;35(2):61-6.
9. Ma JS, Kim WJ, Kim JJ, Kim TJ, Ye SK, Song MD, et al. Gold nanoparticles attenuate LPS-induced NO production through the inhibition of NF- $\kappa$ B and IFN- $\beta$ /STAT1 pathways in RAW264.7 cells. *Nitric Oxide*. 2010 Nov;23(3):214-9.
10. Sumbayev VV, Yasinska IM, Garcia CP, Gilliland D, Lall GS, Gibbs BF, et al. Gold nanoparticles downregulate interleukin-1 $\beta$ -induced pro-inflammatory responses. *Small*. 2013 Feb;9(3):472-7.
11. Lindhe J, Lang NP, Karring T. *Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral*. 5ª ed: Guanabara Koogan: 2010.
12. Hans M, Hans VM. Toll-like receptors and their dual role in periodontitis: a review. *J Oral Sci*. 2011 Sep;53(3):263-71.
13. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 2004 Jul;4(7):499-511.

14. Ferreira MJ. O papel crítico da sinalização TLR/MyD88 no efeito inibitório das proteases Natterinas no recrutamento celular. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2012.
15. Abbas AK, Lichtman AH, V. PSHI. Imunologia celular e molecular. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier: 2012.
16. Baeuerle PA, Henkel T. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol*. 1994;12:141-79.
17. Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med*. 1997;336(15):1066-71.
18. Garlet GP, Cardoso CR, Mariano FS, Claudino M, de Assis GF, Campanelli AP, et al. Regulatory T cells attenuate experimental periodontitis progression in mice. *J Clin Periodontol*. 2010 Jul;37(7):591-600.
19. Gao Y, Grassi F, Ryan MR, Terauchi M, Page K, Yang X, et al. IFN-gamma stimulates osteoclast formation and bone loss in vivo via antigen-driven T cell activation. *J Clin Invest*. 2007 Jan;117(1):122-32.
20. Garlet GP, Cardoso CR, Campanelli AP, Garlet TP, Avila-Campos MJ, Cunha FQ, et al. The essential role of IFN-gamma in the control of lethal *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* infection in mice. *Microbes Infect*. 2008 Apr;10(5):489-96.
21. Dutzan N, Vernal R, Hernandez M, Dezerega A, Rivera O, Silva N, et al. Levels of interferon-gamma and transcription factor T-bet in progressive periodontal lesions in patients with chronic periodontitis. *J Periodontol*. 2009 Feb;80(2):290-6.
22. Garlet GP, Martins W, Jr., Ferreira BR, Milanezi CM, Silva JS. Patterns of chemokines and chemokine receptors expression in different forms of human periodontal disease. *J Periodontal Res*. 2003 Apr;38(2):210-7.
23. Dong C. TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. *Nat Rev Immunol*. 2008 May;8(5):337-48.
24. Sato K, Suematsu A, Okamoto K, Yamaguchi A, Morishita Y, Kadono Y, et al. Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *J Exp Med*. 2006 Nov;203(12):2673-82.
25. Beklen A, Ainola M, Hukkanen M, Gurgan C, Sorsa T, Konttinen YT. MMPs, IL-1, and TNF are regulated by IL-17 in periodontitis. *J Dent Res*. 2007 Apr;86(4):347-51.
26. Ohyama H, Kato-Kogoe N, Kuhara A, Nishimura F, Nakasho K, Yamanegi K, et al. The involvement of IL-23 and the Th17 pathway in periodontitis. *J Dent Res*. 2009 Jul;88(7):633-8.

27. Glowacki AJ, Yoshizawa S, Jhunjhunwala S, Vieira AE, Garlet GP, Sfeir C, et al. Prevention of inflammation-mediated bone loss in murine and canine periodontal disease via recruitment of regulatory lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Nov;110(46):18525-30.
28. Booth J, Wilson H, Jimbo S, Mutwiri G. Modulation of B cell responses by Toll-like receptors. *Cell Tissue Res*. 2011 Jan;343(1):131-40.
29. Gonzales JR. T- and B-cell subsets in periodontitis. *Periodontol* 2000. 2015 Oct;69(1):181-200.
30. Kurt-Jones EA, Liano D, HayGlass KA, Benacerraf B, Sy MS, Abbas AK. The role of antigen-presenting B cells in T cell priming in vivo. Studies of B cell-deficient mice. *J Immunol*. 1988 Jun;140(11):3773-8.
31. Berglundh T, Liljenberg B, Tarkowski A, Lindhe J. The presence of local and circulating autoreactive B cells in patients with advanced periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2002 Apr;29(4):281-6.
32. Donati M, Liljenberg B, Zitzmann NU, Berglundh T. B-1a cells and plasma cells in periodontitis lesions. *J Periodontal Res*. 2009 Oct;44(5):683-8.
33. Birkedal-Hansen H. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. *J Periodontol*. 1993 May;64(5 Suppl):474-84.
34. Garlet GP, Martins W, Jr., Fonseca BA, Ferreira BR, Silva JS. Matrix metalloproteinases, their physiological inhibitors and osteoclast factors are differentially regulated by the cytokine profile in human periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 2004 Aug;31(8):671-9.
35. Baker AH, Edwards DR, Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci*. 2002 Oct;115(Pt 19):3719-27.
36. Goncalves LD, Oliveira G, Hurtado PA, Feitosa A, Takiya CM, Granjeiro JM, et al. Expression of metalloproteinases and their tissue inhibitors in inflamed gingival biopsies. *J Periodontal Res*. 2008 Oct;43(5):570-7.
37. Graves DT, Fine D, Teng YT, Van Dyke TE, Hajishengallis G. The use of rodent models to investigate host-bacteria interactions related to periodontal diseases. *J Clin Periodontol*. 2008 Feb;35(2):89-105.
38. Loiarro M, Ruggiero V, Sette C. Targeting TLR/IL-1R signalling in human diseases. *Mediators Inflamm*. 2010;2010:674363.
39. Sumbayev VV, Yasinska IM. Role of MAP kinase-dependent apoptotic pathway in innate immune responses and viral infection. *Scand J Immunol*. 2006 Jun;63(6):391-400.

40. Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. *Chest*. 2000 Aug;118(2):503-8.
41. Kwan Tat S, Padrines M, Theoleyre S, Heymann D, Fortun Y. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2004 Feb;15(1):49-60.
42. Mayer Y, Elimelech R, Balbir-Gurman A, Braun-Moscovici Y, Machtei EE. Periodontal condition of patients with autoimmune diseases and the effect of anti-tumor necrosis factor-alpha therapy. *J Periodontol*. 2013 Feb;84(2):136-42.
43. Van Dyke TE, van Winkelhoff AJ. Infection and inflammatory mechanisms. *J Clin Periodontol*. 2013 Apr;40 Suppl 14:S1-7.
44. Leibbrandt A, Penninger JM. RANK/RANKL: regulators of immune responses and bone physiology. *Ann N Y Acad Sci*. 2008 Nov;1143:123-50.
45. Garlet GP. Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. *J Dent Res*. 2010 Dec;89(12):1349-63.
46. Bostanci N, Ilgenli T, Emingil G, Afacan B, Han B, Toz H, et al. Differential expression of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin mRNA in periodontal diseases. *J Periodontal Res*. 2007 Aug;42(4):287-93.
47. Nagasawa T, Kiji M, Yashiro R, Hormdee D, Lu H, Kunze M, et al. Roles of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL) and osteoprotegerin in periodontal health and disease. *Periodontol 2000*. 2007;43:65-84.
48. Ugar-Cankal D, Ozmeric N. A multifaceted molecule, nitric oxide in oral and periodontal diseases. *Clin Chim Acta*. 2006 Apr;366(1-2):90-100.
49. Kendall HK, Marshall RI, Bartold PM. Nitric oxide and tissue destruction. *Oral Dis*. 2001 Jan;7(1):2-10.
50. Matejka M, Partyka L, Ulm C, Solar P, Sinzinger H. Nitric oxide synthesis is increased in periodontal disease. *J Periodontal Res*. 1998 Nov;33(8):517-8.
51. Heasman PA, Offenbacher S, Collins JG, Edwards G, Seymour RA. Flurbiprofen in the prevention and treatment of experimental gingivitis. *J Clin Periodontol*. 1993 Nov;20(10):732-8.
52. Oringer RJ. Modulation of the host response in periodontal therapy. *J Periodontol*. 2002 Apr;73(4):460-70.

53. Azoubel MC, Menezes AM, Bezerra D, Oria RB, Ribeiro RA, Brito GA. Comparison of etoricoxib and indomethacin for the treatment of experimental periodontitis in rats. *Braz J Med Biol Res.* 2007 Jan;40(1):117-25.
54. Holzhausen M, Rossa Junior C, Marcantonio Junior E, Nassar PO, Spolidorio DM, Spolidorio LC. Effect of selective cyclooxygenase-2 inhibition on the development of ligature-induced periodontitis in rats. *J Periodontol.* 2002 Sep;73(9):1030-6.
55. Holzhausen M, Spolidorio DM, Muscara MN, Hebling J, Spolidorio LC. Protective effects of etoricoxib, a selective inhibitor of cyclooxygenase-2, in experimental periodontitis in rats. *J Periodontal Res.* 2005 Jun;40(3):208-11.
56. de Almeida LSB. Modulação da resposta do hospedeiro com anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) na terapia periodontal. Piracicaba: Universidade Estadual de Campinas; 2004.
57. Gokhale SR, Padhye AM. Future prospects of systemic host modulatory agents in periodontal therapy. *Br Dent J.* 2013 May;214(9):467-71.
58. Dentino A, Lee S, Mailhot J, Hefti AF. Principles of periodontology. *Periodontol* 2000. 2013 Feb;61(1):16-53.
59. Lebwohl M. Psoriasis. *Lancet.* 2003;361(9364):1197-204.
60. Mayer Y, Balbir-Gurman A, Machtei EE. Anti-tumor necrosis factor-alpha therapy and periodontal parameters in patients with rheumatoid arthritis. *J Periodontol.* 2009 Sep;80(9):1414-20.
61. Romano F, Manavella V, Ercoli E, Aimetti M. Periodontal management of a patient with severe psoriasis: A case report. *Quintessence Int.* 2015;46(6):531-8.
62. Garlet GP, Cardoso CR, Campanelli AP, Ferreira BR, Avila-Campos MJ, Cunha FQ, et al. The dual role of p55 tumour necrosis factor-alpha receptor in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-induced experimental periodontitis: host protection and tissue destruction. *Clin Exp Immunol.* 2007 Jan;147(1):128-38.
63. Jain KK. *The Handbook of Nanomedicine.* Jain PharmaBiotech, Basel, Switzerland: Humana Press: 2008.
64. Roco MC. Nanotechnology: convergence with modern biology and medicine. *Curr Opin Biotechnol.* 2003 Jun;14(3):337-46.
65. Sahoo SK, Parveen S, Panda JJ. The present and future of nanotechnology in human health care. *Nanomedicine.* 2007 Mar;3(1):20-31.

66. Freitas RA, Jr. The future of nanofabrication and molecular scale devices in nanomedicine. *Stud Health Technol Inform.* 2002;80:45-59.
67. Maciel AP, Longo E, Leite ER. Dióxido de estanho nanoestruturado: síntese e crescimento de nanocristais e nanofitas. *Química Nova.* 2003;26(6).
68. Huang X, El-Sayed IH, Qian W, El-Sayed MA. Cancer cell imaging and photothermal therapy in the near-infrared region by using gold nanorods. *J Am Chem Soc.* 2006 Feb;128(6):2115-20.
69. Bhattacharya R, Mukherjee P. Biological properties of "naked" metal nanoparticles. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008 Aug;60(11):1289-306.
70. Mann S. *Nanotechnology and Construction. European Nanotechnology Gateway - Nanoforum report: Institute of Nanotechnology; 2006.*
71. Weir E, Lawlor A, Whelan A, Regan F. The use of nanoparticles in anti-microbial materials and their characterization. *Analyst.* 2008 Jul;133(7):835-45.
72. Fischer HC, Chan WC. Nanotoxicity: the growing need for in vivo study. *Curr Opin Biotechnol.* 2007 Dec;18(6):565-71.
73. Oberdorster G, Oberdorster E, Oberdorster J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect.* 2005 Jul;113(7):823-39.
74. Siddiqi NJ, Abdelhalim MA, El-Ansary AK, Alhomida AS, Ong WY. Identification of potential biomarkers of gold nanoparticle toxicity in rat brains. *J Neuroinflammation.* 2012;9:123.
75. Chen Z, Meng H, Xing G, Chen C, Zhao Y, Jia G, et al. Acute toxicological effects of copper nanoparticles in vivo. *Toxicol Lett.* 2006 May;163(2):109-20.
76. Armstrong B, Hutchinson E, Unwin J, Fletcher T. Lung cancer risk after exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: a review and meta-analysis. *Environ Health Perspect.* 2004 Jun;112(9):970-8.
77. Auffan M, Rose J, Orsiere T, De Meo M, Thill A, Zeyons O, et al. CeO<sub>2</sub> nanoparticles induce DNA damage towards human dermal fibroblasts in vitro. *Nanotoxicology.* 2009 Jan;3(2):161-71.
78. Osorio R, Osorio E, Medina-Castillo AL, Toledano M. Polymer nanocarriers for dentin adhesion. *J Dent Res.* 2014 Dec;93(12):1258-63.
79. Narang RS, Narang JK. Nanomedicines for dental applications-scope and future perspective. *Int J Pharm Investig.* 2015 Jul-Sep;5(3):121-3.



80. Hashimoto M, Sasaki JI, Yamaguchi S, Kawai K, Kawakami H, Iwasaki Y, et al. Gold Nanoparticles Inhibit Matrix Metalloproteases without Cytotoxicity. *J Dent Res*. 2015 Aug;94(8):1085-91.
81. Osorio R, Yamauti M, Osorio E, Ruiz-Requena ME, Pashley D, Tay F, et al. Effect of dentin etching and chlorhexidine application on metalloproteinase-mediated collagen degradation. *Eur J Oral Sci*. 2011 Feb;119(1):79-85.
82. Norton S. A brief history of potable gold. *Mol Interv*. 2008 Jun;8(3):120-3.
83. Juzenas P, Chen W, Sun YP, Coelho MA, Generalov R, Generalova N, et al. Quantum dots and nanoparticles for photodynamic and radiation therapies of cancer. *Adv Drug Deliv Rev*. 2008 Dec;60(15):1600-14.
84. Hammer B, Norskov JK. Why gold is the noblest of all the metals. *Nature*. 1995;376(6537):238-40.
85. Brooking J, Davis SS, Illum L. Transport of nanoparticles across the rat nasal mucosa. *J Drug Target*. 2001;9(4):267-79.
86. Reeves JF, Davies SJ, Dodd NJ, Jha AN. Hydroxyl radicals (\*OH) are associated with titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticle-induced cytotoxicity and oxidative DNA damage in fish cells. *Mutat Res*. 2008 Apr 2;640(1-2):113-22.
87. Yamada M, Foote M, Prow TW. Therapeutic gold, silver, and platinum nanoparticles. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. 2015 May-Jun;7(3):428-45.
88. Jain PK, El-Sayed IH, El-Sayed MA. Au nanoparticles target cancer. *Nano Today*. 2007;2(1):18-29.
89. Pereira MK. Ressonância de Plasmon de Superfície Localizado e Espalhamento Raman em Soluções Coloidais de Ouro. Porto Alegre/RS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2009.
90. Alkilany AM, Murphy CJ. Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: what we have learned so far? *J Nanopart Res*. 2010 Sep;12(7):2313-33.
91. Sabella S, Carney RP, Brunetti V, Malvindi MA, Al-Juffali N, Vecchio G, et al. A general mechanism for intracellular toxicity of metal-containing nanoparticles. *Nanoscale*. 2014 Jun;6(12):7052-61.
92. Han S, Kim K, Kim H, Kwon J, Lee YH, Lee CK, et al. Auranofin inhibits overproduction of pro-inflammatory cytokines, cyclooxygenase expression and PGE<sub>2</sub> production in macrophages. *Arch Pharm Res*. 2008 Jan;31(1):67-74.

93. Bondeson J, Sundler R. Auranofin inhibits the induction of interleukin 1 beta and tumor necrosis factor alpha mRNA in macrophages. *Biochem Pharmacol.* 1995 Nov;50(11):1753-9.
94. Norton S. A brief history of potable gold. *Molecular Interventions.* 2008;8(3):120-3.
95. Tsai CY, Shiau AL, Chen SY, Chen YH, Cheng PC, Chang MY, et al. Amelioration of collagen-induced arthritis in rats by nanogold. *Arthritis Rheum.* 2007 Feb;56(2):544-54.
96. Barathmanikanth S, Kalishwaralal K, Sriram M, Pandian SR, Youn HS, Eom S, et al. Anti-oxidant effect of gold nanoparticles restrains hyperglycemic conditions in diabetic mice. *J Nanobiotechnology.* 2010;8:16.
97. Jeon YJ, Kim YK, Lee M, Park SM, Han SB, Kim HM. Radicol suppresses expression of inducible nitric-oxide synthase by blocking p38 kinase and nuclear factor-kappaB/Rel in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000 Aug;294(2):548-54.
98. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine.* 3 ed. New York: Oxford University Press: 1999.
99. Dalle-Donne I, Aldini G, Carini M, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *J Cell Mol Med.* 2006 Apr-Jun;10(2):389-406.
100. Southorn PA, Powis G. *Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions.* *Mayo Clin Proc.* 1988 Apr;63(4):381-9.
101. Mittal M, Siddiqui MR, Tran K, Reddy SP, Malik AB. Reactive Oxygen Species in Inflammation and Tissue Injury. *Antioxidants & Redox Signaling.* 2014;20(7):1126-67.
102. Adcock IM, Brown CR, Kwon O, Barnes PJ. Oxidative stress induces NF kappa B DNA binding and inducible NOS mRNA in human epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994 Mar;199(3):1518-24.
103. Haddad JJ. Oxygen homeostasis, thiol equilibrium and redox regulation of signalling transcription factors in the alveolar epithelium. *Cell Signal.* 2002 Oct;14(10):799-810.
104. Haddad JJ. Antioxidant and prooxidant mechanisms in the regulation of redox(y)-sensitive transcription factors. *Cell Signal.* 2002 Nov;14(11):879-97.
105. Kamata H, Hirata H. Redox regulation of cellular signalling. *Cell Signal.* 1999 Jan;11(1):1-14.

106. Victor EG, Silveira PC, Possato JC, da Rosa GL, Munari UB, de Souza CT, et al. Pulsed ultrasound associated with gold nanoparticle gel reduces oxidative stress parameters and expression of pro-inflammatory molecules in an animal model of muscle injury. *J Nanobiotechnology*. 2012;10:11.
107. Weinreb M, Nemcovsky CE. In vitro models for evaluation of periodontal wound healing/regeneration. *Periodontol 2000*. 2015 Jun;68(1):41-54.
108. Bosshardt DD, Stadlinger B, Terheyden H. Cell-to-cell communication--periodontal regeneration. *Clin Oral Implants Res*. 2015 Mar;26(3):229-39.
109. 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(0):55-75.
110. Philip D. Synthesis and spectroscopic characterization of gold nanoparticles. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2008 Nov;71(1):80-5.
111. Balasubramanian SK, Yang L, Yung L-YL, Ong C-N, Ong W-Y, Yu LE. Characterization, purification, and stability of gold nanoparticles. *Biomaterials*. 2010;31(34):9023-30.
112. Yan W, Petkov V, Mahurin SM, Overbury SH, Dai S. Powder XRD analysis and catalysis characterization of ultra-small gold nanoparticles deposited on titania-modified SBA-15. *Catalysis Communications*. 2005;6(6):404-8.
113. Martins L. Estudo da flotação de minério silicato de zinco sem a etapa de deslamagem. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2007.
114. Clogston JD, Patri AK. Zeta potential measurement. *Methods Mol Biol*. 2011;697:63-70.
115. Wu L, Zhang J, Watanabe W. Physical and chemical stability of drug nanoparticles. *Adv Drug Deliv Rev*. 2011 May;63(6):456-69.
116. Young JM, Wagner BM, Spires DA. Tachyphylaxis in 12-0-tetradecanoylphorbol acetate- and arachidonic acid-induced ear edema. *J Invest Dermatol*. 1983 Jan;80(1):48-52.
117. Lee KM, Kang BS, Lee HL, Son SJ, Hwang SH, Kim DS, et al. Spinal NF- $\kappa$ B activation induces COX-2 upregulation and contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *Eur J Neurosci*. 2004 Jun;19(12):3375-81.
118. Sponchiado G. Avaliação da eficácia e segurança do extrato da *Malva sylvestris* com potencial atividade para tratamento de disfunções da pele. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2015.

119. Levy L. Carrageenan paw edema in the mouse. *Life Sci.* 1969;8(11, Part 1):601-6.
120. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983 Dec;65(1-2):55-63.
121. Repetto G, del Peso A, Zurita JL. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat Protocols.* 2008;3(7):1125-31.
122. Barile FA. *In vitro* cytotoxicology: mechanisms and methods. 1 ed. Florida 1994.
123. Silveira DB. Padronização de ensaio *in vitro* para triagem de compostos com potencial atividade imunomodulatória sobre linfócitos B. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina; 2011.
124. Singh P, Kumari K, Katyal A, Kalra R, Chandra R. Synthesis and characterization of silver and gold nanoparticles in ionic liquid. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2009 Jul;73(1):218-20.
125. Aswathy Aromal S, Philip D. Green synthesis of gold nanoparticles using *Trigonella foenum-graecum* and its size-dependent catalytic activity. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2012 Nov;97:1-5.
126. Link S, El-Sayed MA. Size and Temperature Dependence of the Plasmon Absorption of Colloidal Gold Nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry B.* 1999;103(21):4212-7.
127. Chen Y, Gu X, Nie C-G, Jiang Z-Y, Xie Z-X, Lin C-J. Shape controlled growth of gold nanoparticles by a solution synthesis. *Chemical Communications.* 2005 (33):4181-3.
128. Albrecht MA, Evans CW, Raston CL. Green chemistry and the health implications of nanoparticles. *Green Chem.* 2006;8(5):417-32.
129. Connor EE, Mwamuka J, Gole A, Murphy CJ, Wyatt MD. Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity. *Small.* 2005 Mar;1(3):325-7.
130. Chithrani BD, Ghazani AA, Chan WC. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano Lett.* 2006 Apr;6(4):662-8.
131. Patra HK, Banerjee S, Chaudhuri U, Lahiri P, Dasgupta AK. Cell selective response to gold nanoparticles. *Nanomedicine.* 2007 Jun;3(2):111-9.

132. Cardoso E. Efeitos da administração de nanopartículas de ouro sobre parâmetros bioquímicos em cérebros de ratos. Criciúma: Universidade do Extremo Sul Catarinense; 2014.
133. Lapresta-Fernández A, Fernández A, Blasco J. Nanoecotoxicity effects of engineered silver and gold nanoparticles in aquatic organisms. *Trends Analyt Chem.* 2012;32:40-59.
134. Marangoni VL. Estudo e desenvolvimento de nanocompósitos contendo nanopartículas de ouro conjugadas com biomoléculas: síntese e aplicações em nanomedicina. São Carlos: Universidade de São Paulo; 2012.
135. Pan Y, Leifert A, Ruau D, Neuss S, Bornemann J, Schmid G, et al. Gold nanoparticles of diameter 1.4 nm trigger necrosis by oxidative stress and mitochondrial damage. *Small.* 2009 Sep;5(18):2067-76.
136. Yen HJ, Hsu SH, Tsai CL. Cytotoxicity and immunological response of gold and silver nanoparticles of different sizes. *Small.* 2009 Jul;5(13):1553-61.
137. Nalwa HS. Nanostructured materials and nanotechnology. San Diego: Academic Press: 2002.