

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MATERIAIS

RAFAEL VITAL DOS SANTOS

**ESTUDO DOS EFEITOS ANTI-INFLAMATÓRIOS DA NANOPARTÍCULA DE
OURO EM MODELO DE ASMA ALÉRGICA EXPERIMENTAL**

Maceió

2014

RAFAEL VITAL DOS SANTOS

**ESTUDO DOS EFEITOS ANTI-INFLAMATÓRIOS DA NANOPARTÍCULA DE
OURO EM MODELO DE ASMA ALÉRGICA EXPERIMENTAL**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Materiais da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Materiais.

Orientador: Prof^o Dr. Emiliano de Oliveira Barreto

Co-orientador: Prof^o Dr. Jandir Miguel Hickmann

Maceió

2014

Catlogação na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecário Responsável: Valter dos Santos Andrade

S237e	<p>Santos, Rafael Vital dos. Estudo dos efeitos anti-inflamatórios da nanopartícula de ouro em modelo de asma alérgica experimental / Rafael Vital dos Santos. – Maceió, 2014. 69f. : il.</p> <p>Orientador: Emiliano de Oliveira Barreto. Co-orientador: Jandir Miguel Hickmann. Tese (Doutorado em Materiais) – Universidade Federal de Alagoas. Centro de Tecnologia. Programa de Pós-graduação em Materiais. Maceió, 2014.</p> <p>Bibliografia: f. 58-67.</p> <p>1. Nanopartícula de ouro. 2. Agentes anti-inflamatórios. 3. Asma. 4. Inflamação alérgica. I. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU: 615.234</p>
-------	--



ATA DA 1ª DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM MATERIAIS

No dia dois de setembro do ano de dois mil e quatorze, às 14 horas e 10 minutos, no LCCV/CTEC, foi iniciado a **DEFESA DE TESE DE DOUTORADO** de Rafael Vital dos Santos, tendo como título: **“Estudo dos efeitos anti-inflamatórios da nanopartícula de ouro em modelo de asma alérgica experimental”**, como requisito parcial obrigatório para obtenção do título de **DOUTOR EM MATERIAIS**. A Banca Examinadora, presidida pelo Prof. Dr. Emiliano de Oliveira Barreto (Orientador - PPGMateriais/UFAL), foi constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. Antonio Osimar Sousa da Silva (PPGMateriais/UFAL), Prof^ª. Dr^ª. Camila Braga Dornelas (ICBS/UFAL), Prof. Dr. Lucindo José Quintans Júnior (UFS), Prof. Dr. Marcio Andre Rodrigues Cavalcanti de Alencar (PPGMateriais/UFAL; UFS), Prof^ª. Dr^ª. Salete Smaniotto (ICBS/UFAL). O candidato fez a sua apresentação em 58 minutos. A Defesa foi encerrada às 18 horas e 25 minutos. Após o encerramento da Defesa, em reunião fechada, a Banca Examinadora, com base no Regimento Interno, decidiu por APROVADO a tese de Doutorado.

Em 02 de Setembro de 2014.



Prof. Dr. Antonio Osimar Sousa da Silva
(PPGMateriais/UFAL)

Prof^ª. Dr^ª. Camila Braga Dornelas
(ICBS/UFAL)

Prof. Dr. Lucindo José Quintans Júnior
(UFS)

Prof. Dr. Marcio Andre Rodrigues Cavalcanti de Alencar
(PPGMateriais/UFAL; UFS)

Prof^ª. Dr^ª. Salete Smaniotto
(ICBS/UFAL)

Prof. Dr. Emiliano de Oliveira Barreto
(Orientador - PPGMateriais/UFAL)

Rafael Vital dos Santos
(Doutorando PPGMateriais)

DEDICATÓRIA

In memoriam

Marly Josefina Santos da Silva

“Uma estrela carregada de beleza, virtudes e ternura que a terra teve a honra de conhecer”.

AGRADECIMENTOS

Ao meu grande amigo e orientador Prof. Dr. Emiliano Barreto pelos valiosos ensinamentos sempre transformando meus problemas em oportunidades com sua experiência de vida durante esses 4 anos nos quais pertenci ao Laboratório de Biologia Celular.

Ao Prof. Dr. Jandir M. Hickmann pelo apoio logístico e Institucional para execução da caracterização das nanopartículas de ouro.

Ao Prof. Cristino Giacomelli da Universidade Federal de Santa Maria pela síntese da nanopartícula de ouro.

A minha mãe, Sebastiana Vital dos Santos (Dona Nega), que me ensinou a ter a garra, força, educação e senso de respeito nos momentos mais difíceis da minha vida e por ensinar os valores necessários para formação do caráter do meu filho Luiz Guilherme Vital de Oliveira Correia.

A minha amiga e parceira, Auridete Maria de Oliveira Correia, que sempre me apoiou, incentivou a realizar meus sonhos sempre que foi possível.

Aos colegas de turma que sempre me auxiliaram a superar as dificuldades das disciplinas do programa de Pós Graduação em Materiais (PPGM).

Aos meus amigos, parceiros e irmãos Cassio Eraclito, Paulo Sergio Carvalho, Laís Agra, Fabíola Brito, Jamilyle Ferro, Anderson Albuquerque, Isabela Fraga, Ana Carolina Carvalho Correia, Marvin Paulo, Talles Lyra, Alex Carvalho e João Paulo Noé que sempre estiveram comigo neste grande desafio, contribuindo ativamente no campo pessoal e acadêmico.

A todos os componentes do Laboratório de Biologia Celular que trabalharam ao meu lado para a conquista deste objetivo: Profa. Dra. Salete Smaniotto, Ana Carolina de Carvalho Correia, Iana Viana, Marvin Paulo, Larissa Vieira e Danielma Reis e a todos os outros que passaram pelo Laboratório de Biologia Celular e que diretamente e indiretamente contribuíram para esta conquista.

A Universidade Federal de Alagoas pela criação inovadora do Programa de Pós-graduação em Materiais com abordagem multidisciplinar permeando os institutos de Física, Química, Ciências Biológicas e da Saúde e centro tecnológico ao qual tive o prazer e satisfação em participar.

A todos os professores do Programa, em especial aos professores Dr. Marcio Alencar, Dr. Eduardo Fonseca, Dr. Severino Marques, Dr. Osimar Silva e Dr^a Solange Cavalcanti pela minha formação intelectual.

Ao apoio das instituições de fomento: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES.

“Quanto mais aumenta nosso conhecimento, mais evidente fica nossa ignorância”.

John F. Kennedy

RESUMO

O tratamento com nanopartículas de ouro (NPs Au) exibem uma variedade de efeitos biológicos, incluindo efeitos anti-inflamatórios. No presente estudo, investigamos o efeito do tratamento intranasal com as NPs Au sobre a resposta inflamatória alérgica induzida por ovalbumina (OVA) em camundongos submetidos ao modelo experimental de asma. Os animais foram sensibilizados nos dias 0, 7 e 14 por via intraperitoneal com 50 µg de OVA. Nos dias 21, 22 e 23 após o estímulo inicial, os animais foram desafiados com OVA (50 µg/25 µl PBS) por via intranasal. O tratamento com as NPs Au (6 ou 60 µg/Kg) ocorreu 1 hora antes do desafio antigênico, sendo a avaliação dos parâmetros biológicos realizada 48 h após o último desafio. O efeito das NPs Au na hiperresponsividade brônquica induzida por metacolina foi investigada por meio da determinação da resistência e elastância; o infiltrado eosinofílico, fibrose peribrônquica e produção de muco foram investigadas através de técnicas histológicas; O infiltrado leucocitário e a produção de mediadores pró-inflamatórios nas vias aéreas induzidos por estímulo alérgico pelo método de ensaio imunoenzimático (ELISA); A produção de espécies reativas de oxigênio *in vitro* e *in vivo* foi mensurada pela redução do nitroblue tetrazolium (NBT) e citometria de fluxo utilizando células marcadas com 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA), respectivamente; A capacidade de interferência das NPs Au sobre a fagocitose, geração de TNF- α e viabilidade em macrófagos murinos foi verificado pela determinação da capacidade fagocítica, ELISA e método de MTT, respectivamente. No pulmão, o tratamento com as NPs Au reduziu o infiltrado eosinofílico após desafio por OVA, atenuou a produção de muco, reverteu o aumento da resistência e elastância pulmonar e reduziu os níveis de IL-4, IL-13, KC, eotaxina-1 e eotaxina-2 no tecido pulmonar. Adicionalmente, *in vitro*, macrófagos expostos as NPs Au em doses não citotóxicas, quando ativados com zimosan apresentaram uma diminuição na produção de espécies reativas oxigenadas (ERO) e a secreção de TNF- α . Em conjunto, nossos resultados demonstraram as propriedades anti-inflamatórias da NPs Au e sua associação com a redução do infiltrado leucocitário, supressão na produção de citocinas pró-inflamatórias e efeito antioxidante. As NPs Au revelaram-se como uma opção terapêutica para o tratamento da inflamação alérgica.

Palavras chave: Nanopartícula de Ouro, Asma e Inflamação.

ABSTRACT

Treatment with gold nanoparticles (Au NPs) exhibit a variety of biological effects, including anti-inflammatory effects. In the present study, we investigated the effect of intranasal treatment with the Au NPs on allergic inflammatory response induced by ovalbumin (OVA) in rats subjected to experimental model of asthma. The animals were sensitized on days 0, 7 and 14 by intraperitoneal injection with 50 mg OVA. On days 21, 22 and 23 after the initial stimulus, the animals were challenged with OVA (50 mg / 25 μ l PBS) intranasally. Treatment with the Au NPs (6 or 60 mg / kg) occurred 1 h before the antigen challenge, and the evaluation of the biological parameters performed 48 h after the last challenge. The effect of Au NPs in airway hyperresponsiveness induced by methacholine was investigated by determining the resistance and elastance; eosinophil infiltration, peribronchial fibrosis and mucus production were investigated using histological techniques; Leukocyte infiltration and production of pro-inflammatory mediators in allergic airways induced stimulation by enzyme-linked immunoassay (ELISA); The production of reactive oxygen species *in vitro* and *in vivo* measures was the reduction of nitroblue tetrazolium (NBT) and flow cytometry using cells labeled with 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA), respectively; The interference ability of Au NPs on phagocytosis, generation of TNF- α in murine macrophages and viability was evaluated by determining the phagocytic capacity, ELISA and MTT method, respectively. In the lungs, treatment with Au NPs reduced eosinophil infiltration after OVA challenge by attenuated production of mucus reversed resistance and increased lung compliance and decreased levels of IL-4, IL-13, KC, eotaxin-1 and eotaxin-2 in the lung tissue. Additionally, *in vitro*, macrophages exposed Au NPs in non-cytotoxic doses, when activated with zymosan showed a decrease in the production of reactive oxygen species (ROS) and secretion of TNF- α . Taken together, our results demonstrate the anti-inflammatory properties of the Au NPs and its association with reduced leukocyte infiltration, suppression of production of proinflammatory cytokines and antioxidant effect. The Au NPs were found to be a therapeutic option for the treatment of allergic inflammation.

Keywords: gold of nanoparticle, asthma and inflammation

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Protocolo de sensibilização com OVA.....	32
Figura 2- Caracterização das NPs Au em solução aquosa. Espectro de UV-Vis das NPs Au.....	38
Figura 3- Caracterização das NPs Au em solução aquosa. Imagens da NPs Au esféricas por MET em A e histograma do diâmetro das NPs Au em B	38
Figura 4- Efeito das NPs Au sobre a resistência pulmonar (A e B) e a elastância (C e D) em animais alérgicos desafiados com OVA durante aerolização com metacolina.....	39
Figura 5- Efeito das NPs Au sobre o infiltrado eosinofílico no pulmão de animais alérgicos estimulados com OVA.....	41
Figura 6- Efeito das NPs Au sobre a produção de muco nas vias aéreas de animais alérgicos estimulados com OVA.....	42
Figura 7- Efeito das NPs Au sobre a deposição de fibras de colágeno no pulmão de animais alérgicos estimulados com OVA.....	43
Figura 8- Efeito das NPs Au na produção de citocinas pró-inflamatórias no tecido pulmonar de animais alérgicos estimulados com OVA.....	44
Figura 9- Efeito das NPs Au sobre o acúmulo de células inflamatórias no BAL de animais alérgicos estimulados com OVA.....	46
Figura 10- Efeito das NPs Au sobre o conteúdo de citocinas pró-inflamatórias no BAL dos animais alérgicos estimulados com OVA.....	44
Figura 11- Efeito das NPs Au na geração intracelular de espécies reativas de oxigênio em células do lavado broncoalveolar.....	46
Figura 12- Efeito das NPs Au na produção de ERO (A), na secreção de TNF- α (B) na viabilidade celular (C) e na fagocitose em macrófagos ativados com zimosan A (D).	47

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1-	Breve histórico da nanotecnologia.....	20
Quadro 2-	Divisão dos grupos experimentais de acordo com critérios de sensibilização e/ou tratamento.....	32
Tabela 1-	Quantificação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico no tecido pulmonar.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APA	Agência de Proteção Ambiental
BAL	Lavado Broncoalveolar
DCFH-DA	2',7'-Diacetato de Diclorofluoresceína
DMSO	Dimeltisulfóxido
EPM	Erro Padrão da Média
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
H&E	Hematoxilina e Eosina
HRB	hiperresponsividade brônquica
IL	Interleucina
IgE	Imunoglobulina tipo E
IP	Intraperitoneal
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MTT	Brometo de 3-metil-[4-5-dimetiltiazol-il]-2,5 difeniltetrazólio
NBT	Nitroblue Tetrazolium
N&N	Nanociência e Nanotecnologia
KOH	Hidróxido de Potássio
NPs Au	Nanopartículas de Ouro
NPs Ag	Nanopartículas de Prata
OVA	Ovalbumina
PAS	Ácido Periódico de Schiff
PBS	Tampão Fosfato Salina
SBCAL	Sociedade Brasileira de Ciências de Animais de Laboratório
SPR	Ressonância de Plasmon de Superfície
TGF- α	Fator de crescimento Tumoral alfa
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
UFAL	Universidade Federal de Alagoas

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 Considerações gerais sobre materiais e nanopartículas.....	18
2.1.1. Materiais Avançados.....	22
2.1.1.1 Nanopartículas poliméricas	22
2.1.1.2 Dendrímeros	23
2.1.1.3 Nanotubo de carbono.....	24
2.1.1.4 Nanopartícula metálicas	25
2.2 ASMA.....	26
2.2.1 Definição.....	26
2.2.2 Fisiopatologia.....	27
2.2.3 Terapias disponíveis para o tratamento da asma.....	27
2.2.4 Aplicação da nanotecnologia na asma.....	29
3. OBJETIVO	31
3.1 Objetivo geral.....	31
3.1.1 Objetivos específicos.....	31
4 METODOLOGIA	32
4.1 Síntese e caracterização das nanopartículas de ouro.....	32
4.2 Modelo de inflamação alérgica pulmonar em camundongos.....	32

4.3	Avaliação das células e fluidos recuperados do lúmen das vias aéreas	33
4.4	Avaliação da produção de mediadores pró-inflamatórios.....	34
4.5	Avaliação do infiltrado eosinofílico, fibrose peribrônquica e produção de muco através da histologia do pulmão.....	34
4.6	Avaliação da hiperresponsividade brônquica.....	35
4.7	Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio nas células do lavado broncoalveolar	35
4.8	Avaliação da peroxidação lipídica – TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) no tecido pulmonar.....	36
4.9	Ensaio <i>in vitro</i>	36
4.9.1	Isolamento de macrófagos peritoneais de camundongo.....	36
4.9.2	Avaliação da viabilidade celular em macrófagos peritoneais tratados com nanopartículas de ouro.....	36
4.9.3	Avaliação da fagocitose em macrófagos peritoneais tratados com nanopartículas de ouro.....	37
4.9.4	Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio em macrófagos peritoneais tratados com nanopartículas de ouro.....	37
4.10	Análise estatística.....	38
5	RESULTADOS	39
5.1	Caracterização das nanopartículas de ouro.....	39
5.2	Efeito das nanopartículas de ouro sobre a hiperresponsividade brônquica.....	40
5.3	Efeito das nanopartículas de ouro sobre os aspectos histopatológico do pulmão após estímulo alérgico.....	41
5.4	Efeito das nanopartículas de ouro sobre a produção de citocinas no tecido pulmonar.....	45

5.5	Efeito das nanopartículas de ouro sobre a produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no tecido pulmonar.....	46
5.6	Efeito das nanopartículas de ouro sobre a resposta inflamatória alérgica em camundongos.....	47
5.7	Efeito das nanopartículas de ouro sobre a produção de citocinas no lavado broncoalveolar.....	48
5.8	Efeito das nanopartículas de ouro sobre a produção de ERO em células do Lavado Broncoalveolar	49
5.9	Efeito das nanopartículas de ouro sobre a ativação de macrófagos <i>in vitro</i>	50
6	DISCUSSÃO	51
7	CONCLUSÕES	57
	REFERÊNCIAS	58

1 INTRODUÇÃO

A Ciência dos Materiais mostra-se como um campo interdisciplinar por aplicar as propriedades da matéria nas áreas de química, engenharia, física, medicina e biologia. O impacto desta aplicação nestas diferentes áreas do conhecimento vem impulsionando a criação de novos materiais com interesse comercial devido ao seu uso inovador (KAMANI; KAMANI, 2006).

No mundo, esta área vem exibindo um rápido crescimento devido à intensa atividade científica, contando, principalmente, com ações de inovação tecnológica. Na América Latina a área de Ciência dos Materiais apresentou um crescimento de 39% no período 2003-2009 e no Brasil cerca de 41%. Isso mostra que nesta região do mundo, que sempre se caracterizou pela intensa produção de matéria prima, agora se mostra atenta à necessidade de avançar com ações científicas para o desenvolvimento de novos materiais (MIRANDA, 2010).

Os materiais avançados, em especial aqueles em escala nanométrica, têm atraído atenção devido ao impacto que tais estruturas podem promover na melhoria da qualidade de vida da população. Entretanto, sintetizar e processar novos materiais, integrando-os com tecnologias de manufatura economicamente eficientes e ecologicamente seguras permanece sendo um grande desafio. Porém, mesmo com a necessidade de superar estes desafios, vislumbra-se que essa nova abordagem científico-tecnológica possa apresentar aplicações em múltiplas áreas, em especial na saúde (FERREIRA; RANGEL, 2009).

A Agência Europeia de Produtos Químicos define como nanomateriais, um material de origem natural, formado acidentalmente ou fabricado, contendo partículas livres, na forma de agregado ou na forma de aglomerado, do qual pelo menos 50% das partículas, na distribuição numérica por tamanho, apresentam uma ou várias dimensões externas que se situam entre 1 e 100 nm. As partículas deste tamanho, ou nanopartículas, possuem grande área superficial apresentando propriedades mecânicas, ópticas, magnéticas e químicas distintas de partículas e superfícies macroscópicas (QUINA, 2004).

As nanopartículas metálicas, em especial as nanopartículas de ouro (NPs Au) tem sido alvo de intensa investigação devido a certas propriedades típicas, incluindo o efeito ressonante de plasmon de superfície, fluorescência e a facilidade na funcionalização. As NPs Au têm sido utilizadas em diversas aplicações como biosensores, diagnóstico por imagem, fototerapia, entrega controlada de fármacos e vetores gênicos (VIGDERMAN et al., 2012; ZHANG et al., 2011).

Dentre as diversas aplicações a entrega controlada de fármacos, merece destaque devido a facilidade de síntese e versatilidade na funcionalização das NPs Au que contribui para o desenvolvimento de nanoestruturas com potencial aplicação terapêutica por ampliar a ação do medicamento, melhorando a preservação do princípio ativo contra a degradação prematura. Neste racional, o uso de um nanossistema metálico pode ainda contribuir para o direcionamento do fármaco em atingir um determinado tecido específico ou célula-alvo (GIBSON et al., 2011; SALMASO et al., 2009; LEE et al., 2006). Cabe destacar que o alto custo para o desenvolvimento de novas moléculas ativas torna os sistemas nanoestruturados de liberação de fármacos uma área bastante promissora.

O ouro como agente terapêutico tem uma longa história, em primeiro lugar, como o metal triturada, em seguida, como um sal solúvel, feito pelos alquimistas e utilizado como elixir de vida, depois incorporados em fármacos para várias doenças, especialmente para o tratamento de diferentes patologias, incluindo as doenças de base inflamatória como o reumatismo (LOIARRO et al., 2010; NORTON, 2008). Embora seus mecanismos de ação ainda não sejam totalmente elucidados, há evidências de que o ouro interfere com a transmissão da sinalização inflamatória (HAN et al., 2008).

Dentre as diversas propriedades biológicas das NPs Au merece destaque a capacidade anti-inflamatória demonstrada pela habilidade de suprimir a atividade da IL-6 e do TNF-alfa proporcionando alívio nos sintomas da artrite em modelos experimentais (ABRAHAM; HIMMEL, 1997). Assim, além do ouro nanoparticulado exibir efeitos farmacológicos relevantes, estas nanoestruturas podem ser funcionalizadas para carrear substância com propriedades anti-inflamatórias já conhecidas, o que estenderia o potencial terapêutico do complexo para garantir sucesso no tratamento (KIM et al., 2012).

As doenças alérgicas afetam cerca de um terço das pessoas em todo o mundo acarretando gastos consideráveis de recursos sociais e econômicos, e, portanto, constituindo um grande problema de saúde pública da atualidade (BLAKEY; SHAW, 2014). No Brasil, a asma é responsável por cerca de 350.000 internações anuais o que representa a quarta causa de hospitalizações pelo Sistema Único de Saúde. Nos últimos anos o nordeste brasileiro vem despontando como a região possuidora do maior número de óbitos por asma em todo país. Neste cenário, Alagoas destaca-se como o Estado da Federação com a maior taxa de mortalidade por asma quando comparado aos outros estados da região Nordeste (BRASIL, 2005).

Portanto, considerando o potencial efeito anti-inflamatório das NPs Au, bem como o impacto das doenças inflamatórias alérgicas na saúde da população, buscou-se neste estudo

avaliar o efeito das NPs Au sobre a resposta inflamatória alérgica utilizando o modelo de asma experimental.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Considerações gerais sobre materiais e nanopartículas

Diferentes eras da civilização foram definidas em relação ao domínio e a elaboração de materiais pelo homem (idades da pedra, do bronze e do ferro). A utilização de materiais para proteção, alimentação, vestimenta e moradia, não só distingue a espécie humana dos outros organismos como também garante a sobrevivência e ascendência sobre outras espécies contribuindo na qualidade de vida (ZABIN, 2007).

A seleção de um determinado material para um uso particular é o um processo complexo. Porém, para simplificar a escolha, detalhes sobre os parâmetros operacionais, os processos de fabricação, os requisitos funcionais e as considerações de custo, podem definir a escolha do material. Considerando todo este volume de informação, o campo de ciências dos materiais classifica os materiais de acordo com o tipo e a finalidade, além de considerar suas propriedades. Assim, temos as seguintes categorias: metais, polímeros, cerâmicas, semicondutores, compósitos e materiais avançados (CALLISTER, 2005; MITCHELL, 2003).

Em geral, todos os elementos são divididos em matérias metálicos e não metálicos. Os materiais metálicos são constituídos de elementos metálicos puros ou em combinação com outros elementos. Estes possuem elétrons desemparelhados em sua estrutura e caracteriza-se pela alta condutividade elétrica, térmica, presença de brilho e maleabilidade aliada a resistência mecânica. São classicamente utilizados como fios condutores como o cobre; materiais para sustentação na construção civil; como o aço, na indústria automobilística, utensílios domésticos dentre outros (KAMANI; KAMANI, 2006).

Na área da saúde, os materiais metálicos são amplamente utilizados, em especial, como elementos estruturais a exemplo de próteses e na estabilização de fraturas ósseas (placas, miniplacas e parafusos utilizados para osteossíntese). As propriedades de resistência mecânica associada à capacidade de deformação e de elevada tenacidade, facilidade de fabricação, além de baixa toxicidade, contribuem para que os materiais metálicos possam ser utilizados como materiais biocompatíveis. A maioria dos elementos metálicos, como ferro, cromo, cobalto, níquel, titânio e suas ligas usadas na confecção de implantes, mostram-se bem tolerados pelos organismos vivos, fazendo desses materiais a principal escolha para o tratamento de fraturas ósseas e para procedimentos ortodônticos (TURRER; FERREIRA, 2008).

Os biomateriais podem ser definidos como qualquer material sintético utilizado para fabricar dispositivos para substituir uma parte ou uma função do corpo ou ainda para funcionar em contato íntimo com o tecido vivo de maneira segura, confiável, econômica e

fisiologicamente aceitável. Uma variedade de dispositivos e materiais é utilizada no tratamento e reabilitação. São exemplos de biomateriais as suturas, as obturações dentárias, os cateteres, as agulhas, as placas ósseas entre outros (PARK; LAKES, 2007).

A nanotecnologia tornou-se uma prioridade atual para a investigação científica e o desenvolvimento tecnológico. Os produtos advindos da nanotecnologia possuem inúmeras aplicações nas mais variadas áreas, como na Engenharia de Materiais, Energia, Eletrônica e Computação. Contudo, as maiores expectativas para a sua aplicação residem na área de Biotecnologia e Saúde, nomeadamente nas implicações que pode gerar na qualidade de saúde das sociedades futuras. Neste campo, a medicina associa-se a nanotecnologia de forma a desenvolver novas terapias para melhorar os tratamentos atualmente utilizados. Na nanomedicina, manipulam-se átomos e moléculas para produzir nanoestruturas para interação com as células humanas. Este procedimento oferece uma gama de novas soluções para o diagnóstico e para os tratamentos inteligentes estimulando os próprios mecanismos de reparações individuais (KIM et al., 2013; MUTHU et al., 2014). No quadro 1 encontra-se resumido os principais marcos históricos da nanotecnologia no mundo e no Brasil.

Quadro 1 - Breve histórico da nanotecnologia

ANO	MARCOS HISTÓRICO DA NANOTECNOLOGIA	REFERÊNCIA
5000 A.C.	Descoberta do ouro na Bulgária. Um exemplo famoso é o copo de Lycurgus, atualmente no museu Britânico em Londres.	BOISSELIER; ASTRUC, 2009
1857	Michael Faraday reportou pela primeira vez as NPs Au, atribuindo cor vermelha ao coloide natural de NPs Au visível em vitrais de catedrais.	FARADAY, 1857
1908	Definição de ressonância de plasmon de superfície (SPR) por Gustav Mie.	HORVATH, 1908
1959	Richard Feynman com trabalho: “There's plenty of room at the bottom”, um marco para a ciência de materiais nanoestruturados.	TOUMEY, 2007
1970	A aplicação de nanopartículas metálicas como nanoconjulgado.	LAI-KWAN; CHANG, 2013
1974	Surge o termo “Nanotechnology” na Universidade de Ciências de Tóquio criado por Norio Taniguchi para descrever a fabricação de materiais com tamanho nanométricos.	TANIGUCHI, 1974
1981	Kim Erick DEXLER publica o primeiro artigo científico sobre nanotecnologia.	PHOENIX; DREXLER, 2004
1982	Gerd Binnig e Heinrich Rohrer desenvolveram o microscópio de varredura por tunelamento que possibilitou, pela primeira vez, a captura de imagens atômicas.	GALEMBECK et al., 2013
1986	Gerd Binnig, Calvin Quate e Christoph Gerber desenvolveram o microscópio de força atômica.	GALEMBECK et al., 2013
1989	IBM manipula 35 átomos de xenônio e escreve com eles sua marca numa placa de níquel.	MARTINS, 2009
1996	Desenvolvimento do método de síntese do nanotubos (fularenos) por Richard E. Smalley.	ADAMS; BAUGHMAN, 2005
1997	Surge a primeira empresa de nanotecnologia molecular “Zyvex®”.	ZYVEX, 2014
	Ned Seeman criou o primeiro dispositivo nanomecânico baseado na molécula de ácido nucléico.	SEEMAN et al., 2010
2001	No Brasil, o primeiro edital específico sobre o tema foi lançado culminando na formação de redes cooperativas de pesquisa.	FERNANDES; FILGUEIRAS, 2008
2001	Os EUA estabelecem a Iniciativa Nacional de Nanotecnologia para promover a competitividade na área de nanotecnologia.	http://www.foresight.org/
2005	Criada a Rede Brasileira de Nanobiomagnetismo coordenada pelo físico Paulo C. de Moraes, da UnB.	FERNANDES; FILGUEIRAS, 2008
2009	A Agência de Proteção Ambiental (EPA) dos EUA define estratégias de pesquisa para entendimento sobre toxicologia dos nanomateriais manufaturados.	EPA, 2014

2.1.1. Materiais Avançados

Os materiais em escala nanométrica ainda apresentam desafios a ser superados. São utilizados em aplicações de alta tecnologia, dispositivo ou produto que opera ou funciona utilizando princípios sofisticados e de alto desempenho, sendo definidos como materiais avançados. Exemplos destes materiais incluem nanopartículas aplicadas à equipamentos eletrônicos, computadores, sistemas de fibra óptica, naves espaciais, aviões, circuitos integrado, armazenamento de informação magnética, monitores de cristal líquido, fibras ótica e outros (ZABIN, 2007; MITCHELL, 2003).

Os materiais funcionalizados em escala nanométrica e com aplicações tecnológicas avançadas, incluem os nanocristais, as nanopartículas, os nanofios, as nanofitas, os nanotubos e os nanocompósitos com potencial de aplicação em catálise, na síntese de colóides, em processos fotoquímicos, no desenvolvimento de sensores e dispositivos eletrônicos, em aplicações médicas, na obtenção de novos fármacos e no controle ambiental (FERREIRA; RANGEL, 2009).

Na terapêutica, grande parte dos tratamentos convencionais, apesar de eficazes, ainda apresentam algumas limitações, como a rápida disponibilidade do agente terapêutico e, conseqüentemente, uma ação terapêutica pouco duradoura. Logo, devido a estas características, muitas vezes são utilizadas concentrações elevadas dos agentes terapêuticos, de modo a garantir que atinjam o local afetado pela doença (HANSBRO et al., 2010). Porém, estas concentrações elevadas visando à terapêutica, produzem igualmente efeitos secundários indesejáveis. Visando minimizar/eliminar estes efeitos indesejáveis, nos últimos anos, despontaram várias alternativas utilizando sistemas nanoestruturados para o tratamento em diferentes situações patológicas, incluindo câncer e processos inflamatórios (KIM et al., 2013).

As bases para uso destas nanopartículas utilizam como estratégia a formação de complexos e/ou confinamento de fármacos nas nanoestruturas ou mesmo se aproveitam de suas propriedades físicas/químicas para atingir seus efeitos farmacológicos. Assim, dentre as diferentes nanoestruturas podemos destacar as nanopartículas poliméricas, os dendrímeros, nanotubos de carbono e as nanopartículas metálicas.

2.1.1.1 Nanopartículas poliméricas

Os polímeros são compostos macromoleculares, de origem natural ou sintética, formados pela repetição de um grande número de unidades químicas estruturais. Podem ser inorgânicos ou orgânicos. Exemplos de materiais poliméricos são plásticos, borrachas e celulose. Normalmente estes materiais apresentam baixas condutividades elétrica e térmica, têm baixa resistência mecânica e não podem ser utilizados para aplicações que requeiram altas temperaturas (ZABIN, 2007).

Há mais de 40 anos os materiais poliméricos têm sido utilizados numa variedade de produtos no campo farmacêutico e biotecnológico. Na primeira geração, os materiais que receberam grande destaque foram aqueles com propriedades biodegradáveis, tais como suturas reabsorvíveis e implantes ortopédicos. Na segunda geração, sistemas de distribuição de fármacos utilizando materiais poliméricos em microescala ou nanoescala para liberação controlada de agentes terapêuticos e de diagnóstico. Na prática, esta nova abordagem na farmacologia possibilita melhorar a eficiência e a segurança de fármacos que tradicionalmente são utilizados pela química medicinal (KAMALY et al., 2012).

Nas nanopartículas poliméricas o fármaco pode ficar confinado no interior da nanopartícula (encapsulado) ou ligado à matriz polimérica (conjugado). Os compostos resultantes podem ter a estrutura de cápsulas, como as nanopartículas poliméricas com núcleo/concha anfifílica, como as micelas (MUTHU et al., 2014; SHI et al., 2014).

Um exemplo de nanoestruturas poliméricas são as ciclodextrinas (CDs), que constituem uma classe de excipientes farmacêuticos com capacidade para formar complexos de inclusão reversíveis com moléculas apolares. A habilidade das CDs em encapsular fármacos tem conseguido melhoras na biodisponibilidade, estabilidade e segurança de inúmeras fórmulas farmacêuticas, tendo mais de 30 medicamentos comercializados no mercado mundial com a presença deste excipiente em suas fórmulas. A aplicação das CDs inclui nanoformulados com clorafenicol para fins oftalmológicos (Cloracil®), o piroxicam antiinflamatórios com apresentação em supositório (Cicladol Brexin®), o Spray nasal com 17β-estradiol hemihidratado para terapia hormonal (Aerodiol®) entre outros (CUNHA-FILHO; SÁ-BARRETO, 2007).

2.1.1.2 Dendrímeros

O termo dendrímero foi inicialmente proposto por Tomalia em 1985 e deriva da palavra grega “dendron”, que significa “árvore”, sendo assim escolhida devido à sua disposição estrutural, contendo três regiões básicas: um núcleo (parte central da estrutura), o interior e a periferia (D’EMANUELE; ATTWOOD, 2005). Os dendrímeros são uma classe diferenciada de polímeros hiper-ramificados, com cerca de 1-100 nm, apresentando alto grau de uniformidade molecular, peso molecular e tamanho determinados. Além disso, o elevado número de ligantes e grupos funcionais confere maior abrangência com alvos celulares e maior segurança quanto à quantidade de fármaco, sendo utilizado para entrega de fármacos em diversos tecidos e células (FAHMY et al., 2007; LEE et al., 2005).

Diversas aplicações biomédicas são descritas na literatura para os dendrímeros. São amplamente estudados como vetores de entrega de DNA, sendo ainda eficientes como opção para o desenvolvimento de sistemas de entrega de RNA de interferência (WU et al., 2013). No campo de nanossistemas de entrega controlada de fármacos, os dendrímeros têm sido explorados para diversos alvos, incluindo direcionamento de anticorpos específicos a antígenos prostáticos, entrega de fármacos oftalmológicos, como também de antimicrobianos e anticâncer, sendo que nestes mostraram habilidade de acumularem-se em tumores sólidos. A citotoxicidade dos dendrímeros mostra-se definida pelo seu tamanho e carga de superfície (DALY et al., 2000; SANZHAKOV et al., 2013; YAVUZ et al., 2013; WILCZEWSKA et al., 2012).

2.1.1.3 Nanotubos de carbono

Os nanotubos de carbono apresentam diversas aplicações que incluem o desenvolvimento de dispositivos eletrônicos e biomédicos, na engenharia tecidual, na nanomedicina, no armazenamento e no transporte de energia e na formação de nanocompósito (MASOTTI; CAPORALI, 2013). Aspectos morfológicos relacionados ao diâmetro e comprimento dos nanotubos de carbono são importante na definição de suas propriedades, como flexibilidade estrutural, condutividade térmica, resistência a tração e elasticidade, contribuindo para uma ampla gama de aplicações no desenvolvimento de materiais avançados (HOOIJDONK et al., 2013).

Devido à estabilidade em sistemas biológicos, características como penetração e mobilidade entre diferentes tecidos pelo organismo torna os nanotubos de carbono uma

promissora nanoestrutura para a área da saúde. Além disso, a sua estrutura organizada, apresenta uma grande região superficial com espaço interno livre, possibilitando o preenchimento com fármacos já usados na terapêutica(WILCZEWSKA et al., 2012).

2.1.1.4 Nanopartículas Metálicas

As nanopartículas metálicas têm despertado atenção de várias áreas, em especial no campo da nanomedicina (MARKOWSKA et al., 2013; VIGDERMANE et al., 2012). Uma das propriedades únicas das nanopartículas metálicas é o fenômeno de ressonância de plasmon de superfície (SPR) definido como oscilação coletiva de elétrons da banda de condução, em resposta ao campo elétrico da radiação eletromagnética de luz. Diversas nanopartículas metálicas em solução coloidal, como a de prata e ouro, exibem forte absorção na região do visível do espectro, possibilitando a sua caracterização por espectroscopia de absorção da região Ultra-Violeta (100-400 nm) e no Visível (400-800 nm), contribuindo para identificação do tamanho, forma e composição (LEE; EL-SAYED, 2006; XIAO; YEUNG, 2014).

As nanopartículas de prata (NPs Ag) são altamente eficientes contra uma ampla faixa de microrganismos, sendo utilizada como agentes antibacterianos/antifúngicos em uma variada gama de aplicações que inclui: desinfetantes, meias, almofadas, chinelos, máscaras, toalhetes húmidos, detergente, sabonete, shampoo, pasta de dente, filtros de ar, revestimentos de refrigeradores, aspiradores, máquinas de lavar, recipientes para armazenamento de alimentos, telefones celulares, e até mesmo em preservativos (BUZEA et al., 2007).

Nos últimos anos, diferentes grupos de pesquisa pelo mundo vêm demonstrando os potenciais das NPs Au e suas aplicações biotecnológicas, o que impacta positivamente no desenvolvimento nas áreas de entrega controlada de fármacos e vetores gênicos, biosensores, diagnósticos por imagem e fototerapia (THAKOR et al., 2011; ZHANG et al., 2011).

Dentre as propriedades peculiares das NPs Au merecem ser destacados o seu efeito SPR, a fluorescência e a facilidade de síntese associada a uma fácil funcionalização. Tais características aliadas à versatilidade na funcionalização, tornam estas nanoestruturas um sistema com amplo espectro de uso no desenvolvimento de materiais avançados para aplicações biomédicas (GIBSON et al., 2011; SALMASO et al., 2009).

Em modelos biológicos de experimentação, foram reportados efeitos terapêuticos das NPs Au, destacando-se a habilidade de suprimir a atividade da IL-6 e do TNF- α , o que proporcionou melhorias nos sintomas da artrite em camundongos (ABRAHAM; HIMMEL,

1997). Além destes achados, há outras evidências que revelam suas propriedades sobre a angiogênese, características que podem ser benéficas para o tratamento da artrite reumatóide (THAKOR et al., 2011; MUKHERJEE et al., 2005). No modelo de isquemia-reperfusão, estas nanopartículas exibiram efeitos imunomoduladores, antioxidantes e, conseqüentemente, atividade reparadora em tecidos cerebrais isquêmicos de ratos (SHAH; VOHORA, 2002). Adicionalmente, as NPs Au têm recebido grande atenção como agentes anti-inflamatórios devido a sua capacidade de inibir a expressão de NF- κ B e as reações inflamatórias subsequentes (KIM et al., 2007; JEON, 2003). Em adição, a atividade inibidora das nanopartículas de ouro sobre a proliferação induzida em células endoteliais fornecem evidências sobre o seu potencial terapêutico no tratamento de doenças inflamatórias crônicas, como no caso das alergias (MUKHERJEE et al., 2005). No entanto, apesar de todas estas características, há poucos estudos relatando os potenciais efeitos terapêuticos dos nanomateriais em modelos de doenças respiratórias (LANONE; BOCZKOWSKI, 2011).

2.2 Asma

2.2.1 Definição

A asma mostra-se como uma doença inflamatória crônica das vias aéreas, da qual participam diversos tipos de células e mediadores envolvidos em uma intensa resposta inflamatória, hipersecreção de muco e hiperresponsividade das vias aéreas, o que ocasiona uma limitação no fluxo do ar (ELIAS et al., 2003). Essa doença possui aspectos etiopatológicos complexos e multifatoriais devido a interações entre a característica genética e exposição a fatores ambientais (pêlo de animais, poeira, ácaro e fumaça de cigarro) e a presença de outros fatores desencadeantes associados (infecções virais, estresse emocional e uso de medicamentos, como aspirina ou betabloqueadores), os quais contribuem para o estabelecimento da crise asmática (CASAGRANDE et al., 2008).

As doenças alérgicas afetam cerca de um terço das pessoas em todo o mundo e constituem um dos grandes problemas de saúde pública da atualidade, sendo responsáveis por gastos consideráveis de recursos sociais e econômicos (BLAKEY; SHAW, 2014). No mundo, 300 milhões de pessoas, incluindo adultos e crianças, são diagnosticadas com asma, demonstrando a grande prevalência desta patologia (PITREZ; STEIN, 2008). No Brasil, ocorrem cerca de 350.000 internações por asma o que faz desta doença a quarta causa de hospitalizações pelo SUS (2,3% do total). Avaliações epidemiológicas utilizando a base de dados do SUS revelaram que nos últimos anos o nordeste brasileiro vem despontando como a

região com o maior número de óbitos por asma em todo país. Cabe mencionar que Alagoas destaca-se como Estado da Federação com maior taxa de mortalidade por asma quando comparado aos outros estados da região Nordeste (BRASIL, 2005).

2.2.2 Fisiopatologia

Nos processos fisiopatológicos das doenças alérgicas podem ser observadas associações entre diferentes tipos celulares, em especial os linfócitos T CD4⁺, que secretam preferencialmente citocinas do tipo 2, como interleucinas (IL)-4, IL-5, IL-9 e IL-13 (HOLGATE, 2008). Todas estas ILs associadas a outros mediadores, tais como prostanoídes, citocinas/quimiocinas e espécies reativas de oxigênio (ERO), são indutoras da migração de células Th2, eosinófilos e mastócitos, que coletivamente alteram a fisiologia pulmonar e podem induzir o remodelamento pulmonar caracterizado por metaplasia brônquica, aumento da musculatura lisa peribronquial e deposição de colágeno (HOSHINOE et al., 2008; MEHTAE et al., 2009; SUGIURA; ICHINOSE, 2008). Cabe mencionar que citocinas como IL-1 β , IL-6 e TNF- α apresentam papel importante nas reações imunológicas por regularem a maturação e ativação de células envolvidas no processo inflamatório (CHUNGE; BARNES, 1999), além de atuarem no desencadeamento do processo asmático quando em níveis elevados no tecido (TILLIE-LEBLONDE et al., 1999).

Os eosinófilos, como uma das células efetoras da resposta inflamatória alérgica, secretam várias classes de mediadores pró-inflamatórios e produzem ERO (HOLGATE, 2008). As ERO apresentam um papel relevante no contexto patológico alérgico, podendo ser considerados como marcador para o processo inflamatório, visto que os danos teciduais mostram-se decorrentes, dentre outros fatores, dos elevados níveis de ERO nas vias aéreas e no tecido pulmonar. A redução da produção de ERO modula a resposta celular acarretando na redução das citocinas pró-inflamatórias, conseqüentemente, sendo considerado um alvo importante para a redução do processo inflamatório alérgico (REYNAERTE et al., 2007). JUNG et al., 2011; NAIK; DIXIT, 2011).

Com base na compreensão destes parâmetros celulares fisiopatológicos nos últimos anos houve um grande avanço no entendimento dos mecanismos de regulação e controle da resposta alérgica, sobretudo em aspectos moleculares de ativação e função de algumas células-alvo. Sabendo-se que não há cura efetiva para as alergias, a proposta do tratamento restringe-se a controlar as manifestações clínicas da doença. Por isso, substâncias que atuem nos eventos fisiopatológicos iniciais, que incluem a orquestração de respostas celulares

iniciados pelo alérgeno, garantem a supressão significativa das manifestações alérgicas (GINA, 2013).

2.2.3 Terapias disponíveis para o tratamento da asma

As terapias atuais para a asma podem ser categorizadas de acordo com duas abordagens: na melhora dos sintomas e prevenir o surgimento dos sintomas (exacerbações) promovendo melhora na função pulmonar, evitando crises e principalmente reduzindo a limitação crônica ao fluxo aéreo, relacionado com a inflamação dos brônquios, promovendo a remodelação das vias aéreas (CHUNG, 2014; SZEFLER, 2014; BEL, 2004).

Na fase sintomática, os broncodilatadores mais usados são os β_2 -agonistas de curta ação (por quatro a seis horas), como o salbutamol, a terbutalina e o fenoterol, sendo os principais agentes terapêuticos de escolha para o alívio dos sintomas da asma. Outra linha de β_2 -agonistas são os de longa duração, como o salmeterol e o formoterol, com efeitos de até 12 horas que, associados à terapia de manutenção com corticosteróides inalatórios, atuam para o melhor controle dos sintomas (ORTEGA, 2014).

Os corticosteróides são os fármacos mais eficazes para o controle da asma, por reduzir as crises e o óbito, sendo recomendados para a asma persistente, independentemente do nível de gravidade (BEL, 2013). Entretanto, a utilização de altas doses, por longo tempo, pode causar efeitos adversos sistêmicos, resultando em retardo do crescimento em crianças, osteoporose e distúrbios metabólicos (BARNES, 2006).

Os antileucotrienos (antiLTs) são classificados em quatro tipos: zafirlukast, ontelukast, pranlukast e zileuton, sendo utilizados para o controle da asma a longo prazo. A adição dos antiLTs à terapia com glicocorticóides inalatórios promove uma melhora dos sintomas dos pacientes asmáticos e reduz a dose de glicocorticóide necessária para o controle da doença. É conhecido que os cisteinil-LTs (C_4 , D_4 e E_4) promovem broncoconstrição, inflamação, remodelamento, produção de muco e hiperresponsividade nas vias aéreas, sendo os antiLTs uma alternativa terapêutica para a redução desses sintomas asmáticos. Entretanto, os anti-LTs são reconhecidamente menos eficientes e com custo mais elevado do que glicocorticóides inalatórios, além de apresentarem uma grande variabilidade na resposta dos pacientes (KAWANO et al., 2014; RIBEIRO et al., 2006).

Uma das principais características da imunopatologia da asma são os elevados níveis de IgE específicas contra um ou mais alérgenos do ar, contribuindo para a inflamação de vias aéreas e a hiperresponsividade brônquica (LECHNER et al., 2013). O omalizumabe, é um

anticorpo monoclonal humanizado que possui a capacidade de ligar-se a IgE livre circulante, prevenindo assim a sua ligação aos mastócitos, com a conseqüente redução na liberação de mediadores da reação alérgica, sendo o único produto biológico aprovado para o tratamento da asma, usado para tratar pacientes mais graves, com asma alérgica persistente dependente de corticosteroides (CAMPO et al., 2013; LECHNER et al., 2013).

A utilização de imunomoduladores para o tratamento da asma deve ser reservada aos pacientes com asma corticoide-resistente ou para aqueles com asma corticoide-dependente, que utilizam altas doses deste fármaco e que mesmo assim apresentam frequentes exacerbações da doença, sendo uma opção para reduzir a dose de corticosteróides e minimizar os efeitos colaterais (CAMPO et al., 2013). Imunomoduladores, tais como sais de ouro, metotrexato, azatioprina, ciclosporina e tacrolimus apresentam benefícios clínicos em alguns pacientes, embora esses efeitos benéficos sejam esporádicos e muitas vezes associados a efeitos colaterais inaceitáveis (HOLGATE et al., 2012).

As cromonas apresentam-se como uma alternativa farmacológica para o tratamento de doenças alérgicas, sendo isoladas a partir da planta medicinal *Amni visnaga*, utilizada por muito tempo no Egito e nos países do leste do Mediterrâneo para o tratamento de doenças respiratórias. As cromonas apresentam efeitos anti-inflamatórios, sendo capazes de diminuir a obstrução brônquica, uma vez que estabilizam os mastócitos, inibindo a liberação de histamina, leucotrienos e reduzem a ativação de eosinófilos, mas seus alvos moleculares ainda não foram identificados (BARNES, 2006).

Mesmos diante de diversas alternativas farmacológicas para o tratamento da asma, ainda permanece como um desafio atual a busca por terapias mais eficazes, com menor custo e que apresentem menores ou ausência de efeitos adversos. Neste contexto, investigar o efeito das nanopartículas de ouro, descrita na literatura como possuidoras de propriedades anti-inflamatórias, poderar contribuir com a descoberta de mais uma opção terapêutica para o tratamento da inflamação das vias aéreas.

2.2.4 Aplicação da nanotecnologia na asma

Pesquisas recentes vêm demonstrando que estruturas desenhadas para agregar mais de uma substância com propriedade anti-inflamatória podem ser opções terapêuticas de sucesso para o tratamento de diversas doenças, incluindo as alérgicas. Neste racional, as nanopartículas vêm se destacando por apresentarem-se como opções para o tratamento e diagnóstico de inúmeros processos patológicos, incluindo as inflamações (KIM et al., 2007).

Para isso, técnicas inovadoras estão sendo desenvolvidas/aplicadas para obtenção de novas estruturas, a fim de garantir a liberação controlada de fármacos capazes de manter ou ampliar a ação de agentes anti-inflamatórios (LEE et al., 2006). Cabe destacar que o alto custo para o desenvolvimento de novas moléculas ativas tornam os sistemas nanoestruturados uma ferramenta bastante promissora. Isso porque a nanotecnologia mostra-se capaz de resgatar fármacos que foram descartados do uso clínico por causa da descoberta de potenciais efeitos colaterais ou baixa biodisponibilidade, além de gerar novas patentes.

Vários tipos de nanopartículas podem melhorar a cinética, biodistribuição e a liberação de um fármaco. Além de proteger o princípio ativo contra a degradação prematura e promover sua solubilização, o uso de um nanossistema apropriado pode ajudar auxiliar no direcionamento para o seu tecido ou célula-alvo (KIM et al., 2007). O uso das nanopartículas como agente terapêutico tem ganhado destaque. Um exemplo são as nanopartículas de prata que atenuam a inflamação e hiperresponsividade das vias aéreas quando administradas localmente, com tamanho e forma definido (PARK et al., 2010). Outros trabalhos demonstram que as NPs Au têm revelado diferentes aplicações na área da saúde devido a sua biocompatibilidade e fácil conjugação com biomoléculas (SOKOLOV et al., 2003; LEVY et al., 2004; TSAI et al., 2004). Assim, mesmo que alguns estudos relatem as propriedades anti-inflamatórias das NPs Au, ainda não estão completamente esclarecidos os mecanismos celulares e moleculares responsáveis pelos seus efeitos. Além disso, não há indícios da atuação terapêutica das NPs Au sobre as doenças inflamatórias de origem alérgica, como a asma. Neste contexto, estudos que revelem o papel dos nanomateriais, especialmente NPs Au, na fisiopatologia de doenças pulmonares, podem representar um avanço na busca de novas alternativas para o tratamento de desordens de origem alérgica. Tal fato garante um promissor campo para investigação e inovação de produtos aplicáveis a saúde baseados na nanotecnologia.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Caracterizar o efeito das nanopartículas de ouro sobre a resposta inflamatória alérgica induzida por ovalbumina no modelo de asma em camundongos.

3.1.1 Objetivos específicos

- ✓ Realizar a caracterização física das nanopartículas de ouro definindo composição, tamanho e forma;
- ✓ Avaliar o efeito das nanopartículas de ouro na hiperresponsividade brônquica induzida por metacolina em animais alérgicos;
- ✓ Analisar os aspectos histopatológicos do tecido pulmonar após tratamento com as NPs Au seguido da estimulação antigênica;
- ✓ Avaliar o efeito das nanopartículas de ouro sobre o infiltrado leucocitário e a produção de mediadores pró-inflamatórios nas vias aéreas induzidos por estímulo alérgico;
- ✓ Investigar o efeito das nanopartículas de ouro na produção de espécies reativas de oxigênio *in vivo* e *in vitro*.
- ✓ Analisar a interferência das nanopartículas de ouro sobre o evento de fagocitose e geração de TNF- α por macrófagos murinos.

4 METODOLOGIA

4.1 Síntese e caracterização das nanopartículas de ouro

As NPs Au foram sintetizadas e estabilizadas em citrato de sódio de acordo com Jana e colaboradores (2001). Uma solução de íon de ouro com 120 mg de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3(\text{H}_2\text{O})$ foi dissolvido em 250 mL de água ultrapura até a formação de bolhas, sendo então adicionado 50 mL da solução de citrato de sódio (1%), um agente redutor, permanecendo em aquecimento até ebulição. Toda vidraria utilizada na síntese foi previamente lavada com água regia.

A morfologia e o diâmetro médio das NPs Au foram avaliados utilizando imagens de microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (MET) (FEI Tecnai 20) na voltagem de aceleração de 200 kV. Para análise, uma alíquota da amostra foi adicionada no “grid” de cobre e revestida com carbono. O histograma da distribuição do tamanho das nanopartículas na solução coloidal foi obtido pela medição de 500 partículas selecionadas aleatoriamente nas imagens. O espectro de absorção foi obtido em espectrofotômetro (UV-Vis) no intervalo de comprimento de onda entre 300-800 nm com auxílio de cubetas de quartzo de 10 mm de espessura com volume final de 2,5 mL a 25 °C. Antes dos ensaios biológicos as amostras de NPs Au foram dispersas por sonicação durante 10 minutos, em seguida esterilizada em filtro com poro de 0,22 μm de diâmetro.

4.2 Modelo de inflamação alérgica pulmonar em camundongos

Foram utilizados camundongos da linhagem Swiss e A/J pesando entre 18-22 g, provenientes do biotério central da Universidade Federal de Alagoas (UFAL) e Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), respectivamente. Antes dos experimentos os animais foram mantidos sob dieta alimentar a base de ração tipo pellets com acesso a água ad libitum, com ventilação e temperatura constante (22 ± 2 °C) e ciclo claro-escuro de 12 horas. Todos os procedimentos experimentais realizados seguiram os princípios e diretrizes da Sociedade Brasileira de Ciências de Animais de Laboratório (SBCAL), sendo o projeto aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de animal da UFAL (Licença nº 014512/2011-65).

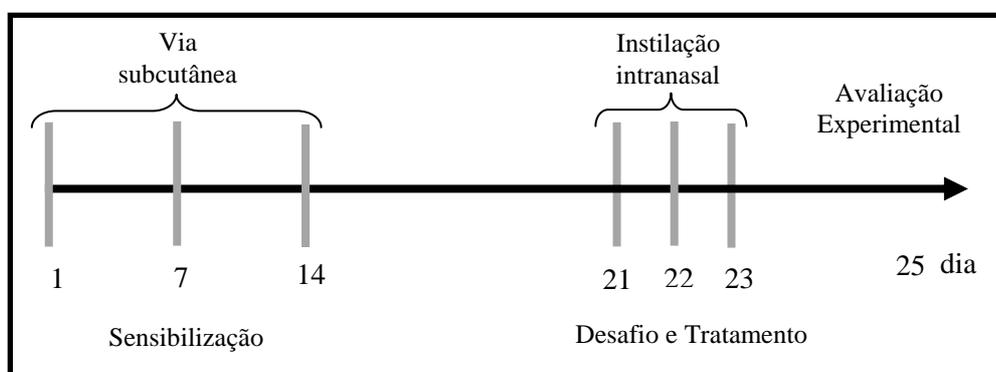
A indução da inflamação alérgica pulmonar nos camundongos seguiu o protocolo descrito por Conrad e colaboradores (2009) com algumas modificações. Os animais foram sensibilizados nos dias 1, 7, e 14 por via subcutânea com um volume final de 200 μL de uma mistura contendo ovalbumina 50 μg de OVA e 5 mg hidróxido de alumínio diluídos em

salina (NaCl, 0,9%) conforme o Quadro 2. O desafio antigênico ocorreu por instilação nasal de OVA (50 µg/25 µL) nos dias 21, 22 e 23 após sensibilização. O tratamento com as NPs Au (6 ou 60 µg/Kg) ocorreu 1 hora antes do desafio antigênico, sendo a avaliação dos parâmetros biológicos realizada 48 h após o último desafio de acordo com o protocolo experimental (Figura 1).

Quadro 2 - Divisão dos grupos experimentais de acordo com os critérios de sensibilização e/ou tratamento.

Grupo (n = 6)	Exposição		
	Salina	Ovalbumina	NPs Au
Salina (SAL)	+	-	-
Ovalbumina (OVA)	+	+	-
Ovalbumin + NPs Au (NPs Au/OVA) 6 µg/Kg	-	+	+
Ovalbumin + NPs Au (NPs Au/OVA) 60 µg/Kg	-	+	+

Figura 1 - Protocolo de sensibilização com OVA.



FONTE: Elaborado pelo autor.

4.3 Avaliação das células e fluidos recuperados do lúmen das vias aéreas

Após o período de 48 h do último estímulo antigênico, os camundongos foram eutanasiados em câmara de CO₂ para posterior dissecação e isolamento da traqueia, com o auxílio de pinça e tesoura cirúrgica. Uma cânula plástica conectada a uma seringa foi introduzida na traqueia, sobre a qual foi injetado 1 mL de tampão fosfato salina (PBS)/EDTA (10 mM). Em seguida, o lavado broncoalveolar (BAL) foi aspirado e transferido para

microtubos e centrifugados a 1.500 rpm a temperatura de 4 °C por 10 min. O sobrenadante foi recolhido e acondicionado a - 80 °C para posterior quantificação de citocinas. As células do pellet foram ressuspensas em 1 mL de PBS para posterior análise celular.

A contagem dos leucócitos totais do BAL foi realizada utilizando alíquotas do lavado diluídos (1:5) com Türk e avaliados sob microscopia óptica com o auxílio da câmara de Neubauer. A contagem diferencial das células foi realizada em lâminas de vidro contendo citocentrifugados corados com May-Grunwald-Giemsa. Foi realizada a contagem de 100 células em campos aleatórios para determinação da frequência de cada tipo celular em microscopia óptica (Olympus BX51) com a objetiva de imersão (100X).

4.4 Avaliação da produção de mediadores pró-inflamatórios

A quantificação de citocinas (IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6 e TNF- α) foi realizada utilizando o kit comercial (Ready-Set-Go® ELISA - eBioscience). Uma amostra do pulmão foi removida para posterior quantificação de KC, IL-4, IL-13 (Duoset; R&D Systems, Minneapolis, MN), Eotaxina-1 e Eotaxina-2 (R&D Systems). Todos os procedimentos de quantificação foram realizados pelo método de ensaio imunoenzimático (ELISA) e os parâmetros do leitor de microplacas foram definidos de acordo com as instruções dos protocolos dos fabricantes dos kits.

4.5 Avaliação do infiltrado eosinofílico, fibrose peribrônquica e produção de muco através da histologia do pulmão

Os fragmentos do pulmão dos camundongos estimulados foram fixados em solução contendo paraformaldeído (4%) para preservação da arquitetura do tecido pulmonar visando a obtenção de cortes histológicos (4 μ m) para posterior coloração por Sirius Red Llewellyn's e visualização dos eosinófilos. Para determinação do infiltrado eosinofílico pulmonar foram selecionados aleatoriamente 6 campos para quantificação do número de eosinófilo/unidade de área (μ m²).

Em outro corte histológico, as amostras de tecido foram corados com ácido periódico de Schiff (PAS) para mensurar a produção de muco. As áreas com presença de muco no epitélio respiratório foi mensurada usando imagens digitalizadas, sendo os dados representados pela média \pm E.P.M. dos pixels das áreas com a presença de muco.

A coloração com tricrômico de Gomori na região peribrônquica foi realizada para identificar o remodelamento brônquico pela deposição de fibras de colágeno entre o septo alveolar e o epitélio das vias aéreas. A avaliação foi realizada através da digitalização das imagens obtidas em um microscópio de luz com amplificação de 400 X, sendo os resultados expressos em área de deposição da matriz extracelular (μm^2).

4.6 Avaliação da hiperresponsividade brônquica

Todo o procedimento seguiu a metodologia descrita por Serra e colaboradores (2012). A hiperresponsividade brônquica (HRB) foi avaliada 48 h após o último desafio alérgico pela mudança das funções das vias aéreas após aerolização com metacolina. Os animais da linhagem A/J foram anestesiados com nembutal (60 mg/kg), via intraperitoneal. Posteriormente foram traqueostomizados e mecanicamente ventilados para determinação da dinâmica de complacência (mL/cmH₂O) e resistência transpulmonar (cmH₂O/mL/s).

Os animais foram estabilizados por 5 min, e em seguida, concentrações crescentes de metacolina (3, 9, e 27 mg/mL) foram aerolizadas a cada 5 minutos. As alterações basais na resistência e na dinâmica de complacência foram inicialmente mensuradas após a aerolização com PBS. Os camundongos respirando espontaneamente foram monitorados usando sistema de pletismografia ligado a um transdutor de pressão, que possibilita mensurar volumes e fluxos deslocados dentro do plestimógrafo durante a respiração dos animais (Buxco Electronics, Sharon, CT). Os resultados foram expressos pela média do valor absoluto da resistência e da elastância gravadas a cada 5 minutos após a administração da metacolina.

4.7 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio nas células do lavado broncoalveolar

A geração de ERO nas células obtidas do BAL foi quantificada por citometria de fluxo utilizando células marcadas com 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA). As células do BAL foram incubadas com 5 μM de DCFH-DA por 30 min em 25 °C. Todas as mensurações foram realizadas no citômetro de fluxo FACSCantoII utilizando laser de argônio em 488 nm (FL1). Para mensurar a produção de ERO foi utilizado como parâmetro a intensidade da fluorescência de 10.000 eventos por amostra utilizando o programa win.mdi 2.9.

4.8 Avaliação da peroxidação lipídica – TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) no tecido pulmonar

Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico permitem quantificar malondialdeído (MDA), definido como produto final da peroxidação lipídica, atuando como marcador para o estresse oxidativo. As amostras do tecido pulmonar foram maceradas e submetidas a centrifugação. O sobrenadante foi misturado com 10% de ácido tricloroacético e 0,8% ácido tiobarbitúrico e aquecido em banho-maria por 60 min. TBARS foram determinados pela absorvância no comprimento de onda 532 nm e calculado como nmol TBARS/mg de proteína.

4.9 Ensaio *in vitro*

4.9.1 Isolamento de macrófagos peritoneais de camundongo

Macrófagos peritoneais de camundongos Swiss foram recuperadas após injeção de 5 ml de PBS gelado no peritônio. Em seguida, o fluido foi removido com o auxílio de seringa e submetido à centrifugação (1500 rpm) por 10 min a 4° C. O sobrenadante foi desprezado e o pellet foi ressuspensionado em 1 mL de meio RPMI suplementado com SBF (10%). A contagem das células foi realizada em microscopia ótica com o auxílio da câmera de Neubauer. Após a contagem, as células (10^5) foram distribuídas por poço em placa de 96 poços e mantida por 2 h em estufa de CO₂, para adesão dos macrófagos. As células não aderentes foram removidas por lavagem com PBS.

4.9.2 Avaliação da viabilidade celular em macrófagos peritoneais tratados com nanopartículas de ouro

A viabilidade de células expostas às NPs Au foi avaliada pelo método de MTT. Neste método o reagente MTT (brometo de 3-metil-[4-5-dimetiltiazol-il]-2,5 difeniltetrazólio) torna-se reduzido em cristais de formazan nas mitocôndrias de células metabolicamente ativas pela succinase desidrogenase. A quantificação da viabilidade celular foi mensurada pela produção destes cristais quando dissolvidos em dimetil-sulfoxido (DMSO) utilizando espectrofotômetro (630 nm). Os macrófagos ($2,5 \times 10^5$) foram adicionados em placas de 96 poços e expostos as concentrações de 10, 100, 1000 ng/mL de NPs Au por 24 h. As nanopartículas foram dispersas em meio de cultura RPMI 1640 completo com ciprofloxacina

(2 mg/mL), L-glutamina (01%), e SFB (10%). Após o período de exposição, o meio de cultura foi descartado e os macrófagos foram incubados com MTT (5 mg/ml) e com meio RPMI, durante 4 h em atmosfera úmida com 5% de CO₂. Em seguida, a solução foi descartada sendo adicionados 150 µL de DMSO em cada poço. A densidade óptica foi determinada no leitor de microplacas no comprimento de onda de 540 nm. A média dos valores das absorvâncias obtidas das células não tratadas (controle viável) foi considerada como 100% de viabilidade celular.

4.9.3 Avaliação da fagocitose em macrófagos peritoneais tratados com nanopartículas de ouro

Para avaliar a interferência das NPs Au sobre a fagocitose, macrófagos foram expostos às NPs Au, e em seguida estimulados com partículas de zimosan A. As análises foram realizadas utilizando microscópio óptico. As células ($2,5 \times 10^5$) foram mantidas em estufa de CO₂, a 37 °C por 2 h em placas de 24 poços contendo lamínulas para adesão. Em seguida, o sobrenadante foi descartado para remoção das células não aderentes. Os macrófagos foram então expostos às concentrações de NPs Au (10, 100, 1000 ng/mL) por 24 h. Após este período, o meio de cultura foi removido e as células aderentes lavadas com PBS. Posteriormente, foi adicionado partículas de zimosan A (5×10^6) em cada poço por 2 h. Após este tempo, o sobrenadante foi removido e os poços foram novamente lavados com PBS. As células foram fixadas com 400 µL metanol por 10 min e coradas com Giemsa (1:10) por 8 min. A avaliação da fagocitose foi expressa pela capacidade fagocítica (CF) determinada pelo número de células que fagocitaram quatro ou mais partículas/100.

4.9.4 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio em macrófagos peritoneais tratados com nanopartículas de ouro

A produção de ânion superóxido foi avaliada pelo método colorimétrico que mensura a redução do nitroblue tetrazolium (NBT). O NBT quando exposto a ERO é reduzido a cristais de formazan de coloração azul, sendo retido no citoplasma da célula. Assim, a quantidade de cristais formados é diretamente proporcional a quantidade de ERO produzidas. A densidade óptica resultante do teste de NBT foi determinada pela absorvância na espectrofotometria.

Os macrófagos ($2,5 \times 10^5$ células por poço) foram cultivados em placas de 96 poços e mantidos em estufa de CO_2 , a 37°C por 2 h. Em seguida, as células foram expostas nas concentrações variadas de NPs Au (10, 100, 1000 ng/mL) por 24 h. Após este período, uma solução de NBT (0,1%) foi adicionada e mantida sobre as células por 1 h ao abrigo de luz em estufa de CO_2 . Em seguida, o sobrenadante foi removido e os poços foram lavados com 200 μL de PBS. A seguir, foi adicionado 200 μl da solução reveladora composta por 90 μl de KOH (2M) e 110 μl de DMSO. A leitura da placa foi realizada no espectrofotômetro no comprimento de onda de 630 nm.

4.10 Análise estatística

Todos os resultados obtidos foram expressos como média e erro padrão da média (E.P.M.) e as diferenças entre as medias foram avaliadas estatisticamente através da análise de variância (ANOVA) “One Way”, seguido do pós-teste de Tukey. As diferenças entre as médias foram consideradas significantes quando os valores de $p < 0,05$. Todos os resultados foram analisados utilizando o auxílio do programa Graphpad Prism versão 5.0 (graphpad software Inc., San Diego CA, EUA).

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização das nanopartículas de ouro

As NPs Au foram sintetizadas no Laboratório de Polímeros e Coloides da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) sob supervisão do Dr. Cristiano Giacomelli, um dos pesquisadores integrantes da nossa Rede de Pesquisa em Nanobiotecnologia. Após a síntese, a caracterização física das amostras foi realizada nos Laboratórios do Grupo Optma, Instituto de Física da Universidade Federal de Alagoas (IF-UFAL) sob supervisão do Dr. Jandir Miguel Hickman. As NPs Au apresentaram na região visível do espectro uma banda com pico máxima de absorção de 530 nm, devido o efeito de ressonância de plasmon de superfície (Figura 2). As imagens de MET (Figura 3A) mostram a dispersão das NPs Au esféricas com diâmetro médio de 13 nm (Figura 3B).

Figura 2 - Caracterização das NPs Au em solução aquosa. Espectro de UV-Vis das NPs Au.

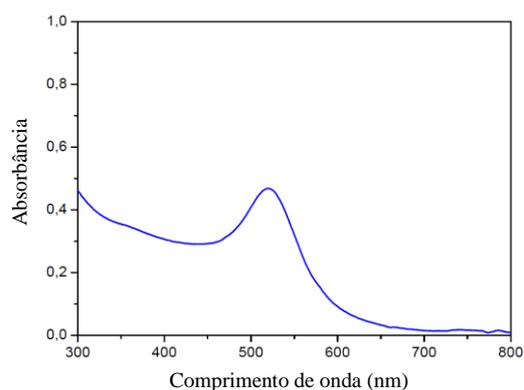
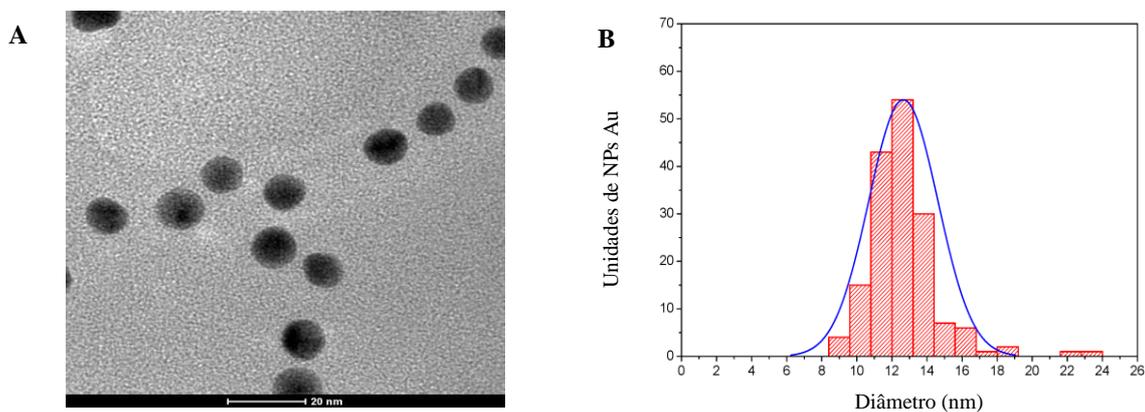


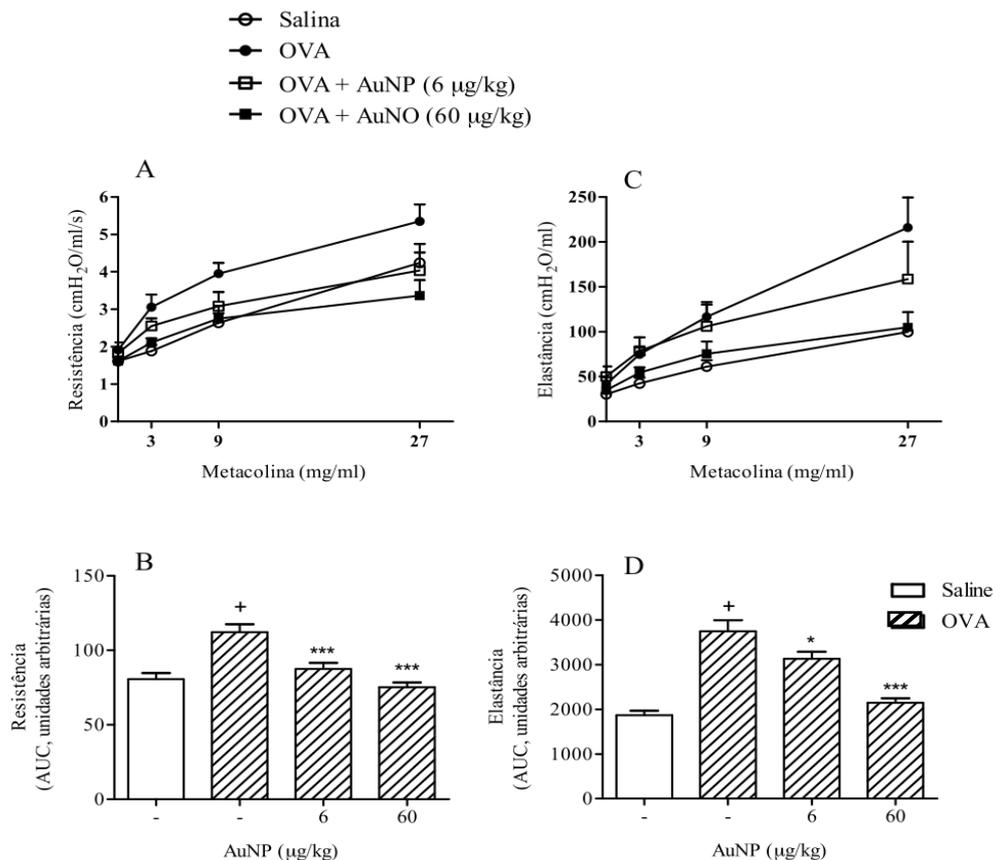
Figura 3 - Caracterização das NPs Au em solução aquosa. Imagens da NPs Au esféricas por MET em **A** e histograma do diâmetro das NPs Au em **B**.



5.2 Efeito das nanopartículas de ouro sobre a hiperresponsividade brônquica

O desafio com OVA em camundongos sensibilizados causou um aumento da HRB, como demonstrado pelo aumento da resistência e da elastância após o estímulo com metacolina (3-27 mg/mL) (Figura 4A e 4C, respectivamente) quando comparado com o grupo salina. O tratamento com as NPs Au reduziu de modo significativo a HRB em animais alérgicos estimulados com OVA (Figura 4A e 4C). As Figuras 4B e 4D representam os valores em barra da área sobre a curva (AUC) referente a resistência pulmonar e elastância, respectivamente.

Figura 4 - Efeito das NPs Au sobre a resistência pulmonar (A e B) e a elastância (C e D) em animais alérgicos desafiados com OVA durante aerolização com metacolina.



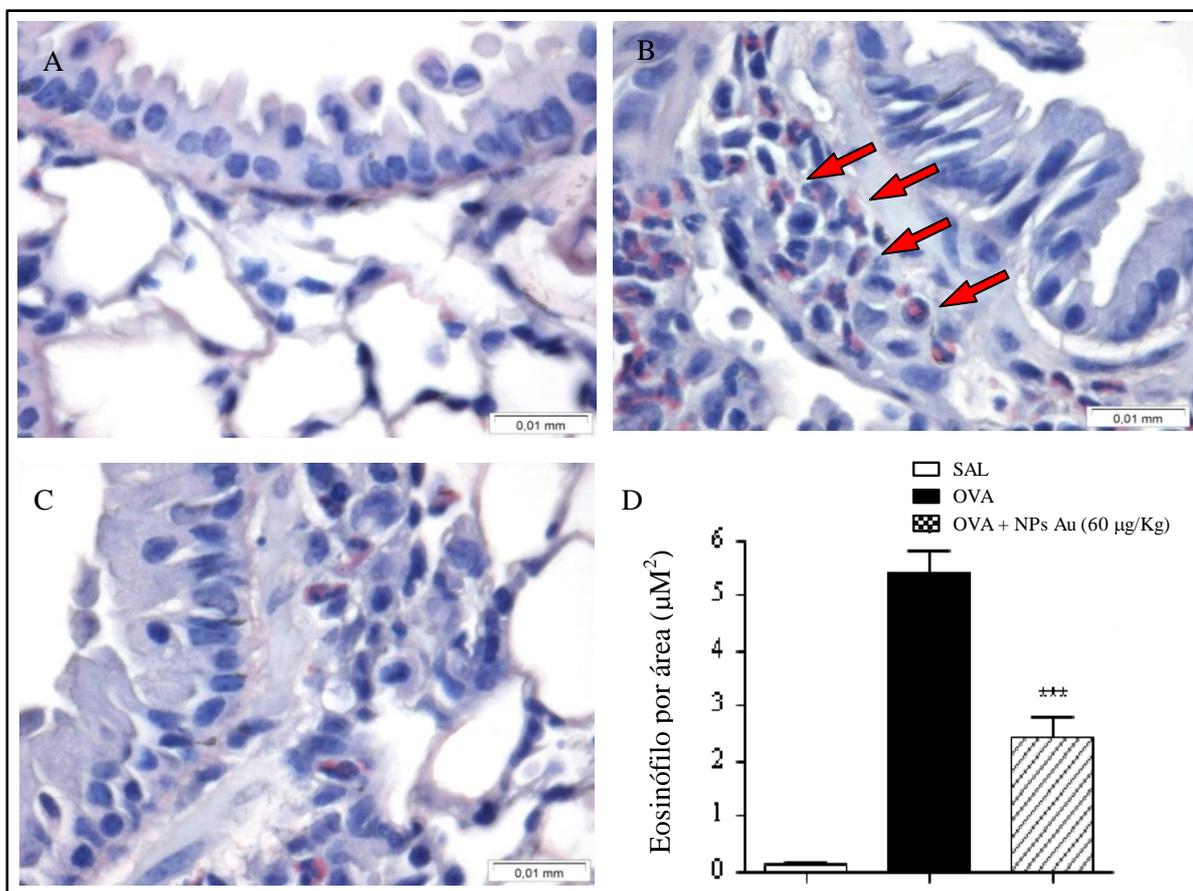
Os gráficos em barras representam a média \pm E.P.M da área sob curva (AUC) dos valores obtidos nos respectivos gráficos A e B. ANOVA seguida do pós teste de Tukey. + $P < 0,001$ (SAL vs. OVA) e * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ (OVA vs. OVA + NPs Au 6 µg/Kg ou NPs Au 60 µg/Kg).

FONTE: Elaborado pelo autor.

5.3 Efeito das nanopartículas de ouro sobre os aspectos histopatológicos do pulmão após estímulo alergênico

A figura 5A revela a característica histológica do pulmão obtido de animais alérgicos estimulados com salina e submetidos a coloração com Sirius Red Llewellyn's, onde nota-se ausência de eosinófilos. Um perfil diferente foi observado no tecido pulmonar de animais alérgicos desafiados com OVA onde é notável o acúmulo de eosinófilos (Figura 5B). Os animais alérgicos desafiados com OVA e tratados com 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de NPs Au apresentaram redução do infiltrado de eosinófilos (Figura 5C). A Figura 5D representa os valores em barras da contagem de eosinófilos por área de tecido (μm^2).

Figura 5 - Efeito das NPs Au sobre o infiltrado eosinofílico no pulmão de animais alérgicos estimulados com OVA.



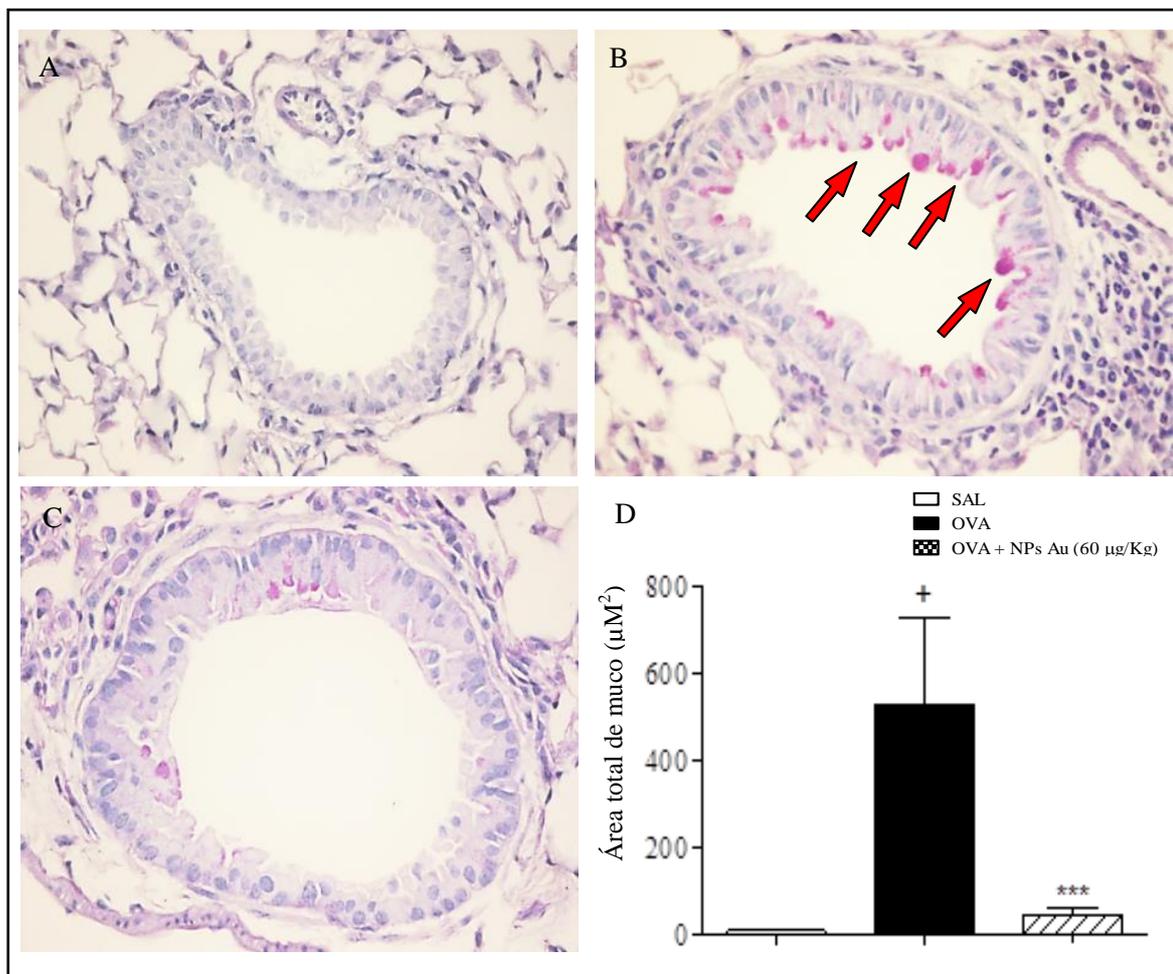
Fotomicrografia do pulmão corado com Sirius Red Llewellyn's no aumento de 200X. Imagem do pulmão de animais do grupo salina em (A), animais alérgicos desafiado com OVA em (B), animais alérgicos estimulados e tratados com 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de NPs Au em (C), e gráfico de quantificação dos eosinófilos no tecido pulmonar dos grupos avaliados em (D). As colunas representam a média \pm E.P.M., ANOVA seguida do pós-teste de Tukey. + $P < 0,001$ (SAL vs. OVA) e *** $P < 0,001$ (OVA vs. OVA + NPs Au 60 $\mu\text{g}/\text{Kg}$). As setas indicam a presença de eosinófilo no tecido pulmonar.

FONTE: Elaborado pelo autor.

Outro aspecto histológico avaliado foi a produção de muco nos brônquios, avaliada através da coloração do tecido pulmonar com ácido periódico de Shift (PAS). Na figura 6A foi observado nos bronquíolos dos animais sensibilizados, estimulado com salina, onde nota-se ausência de células contendo muco. No entanto, quando observamos o tecido obtido de animais alérgicos e estimulados com OVA verificou-se um aumento na marcação de células produtoras de muco (Figura 6B). Em contraste, os animais alérgicos tratados com as NPs Au

exibiram uma redução na produção de muco (Figura 6C). A figura 6D representa os valores em barras referente a quantificação do muco por área de tecido (μM^2).

Figura 6 - Efeito das NPs Au sobre a produção de muco nas vias aéreas de animais alérgicos estimulados com OVA.



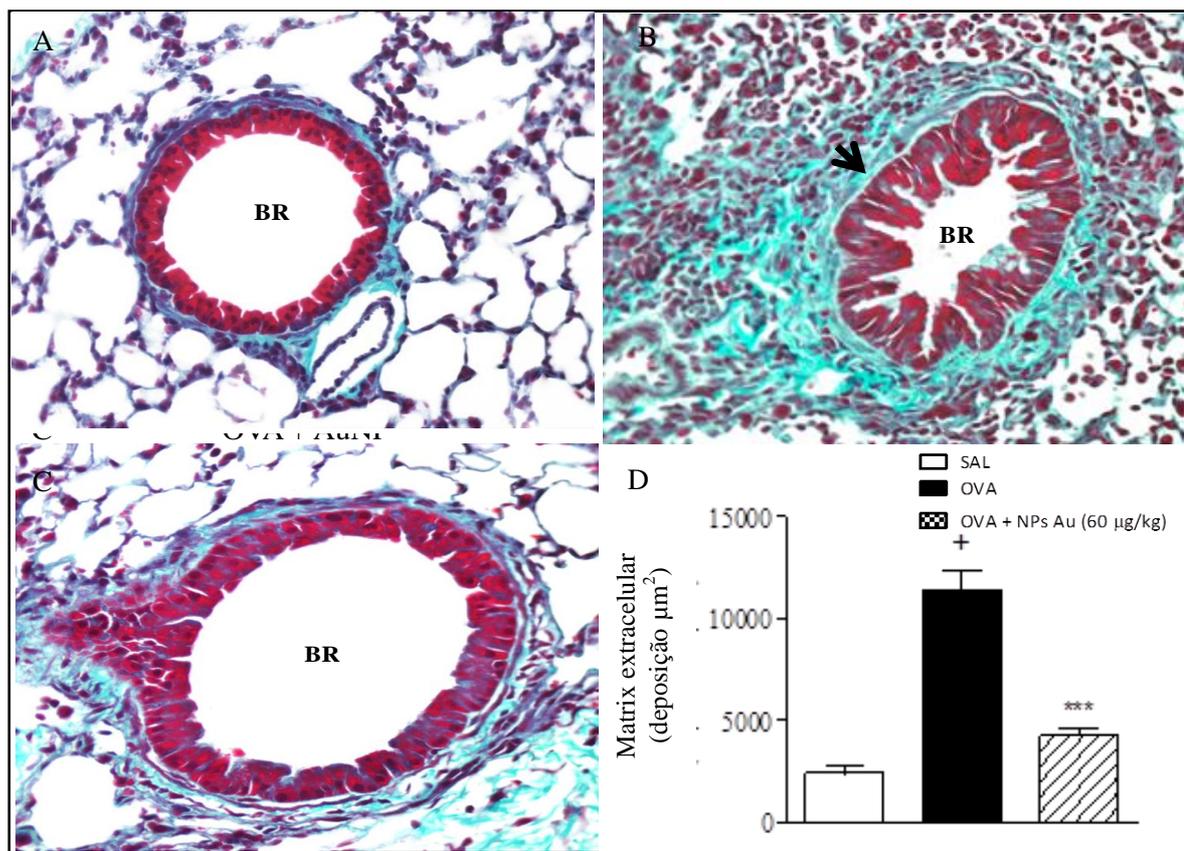
Fotomicrografia do pulmão corado com PAS no aumento de 200X. A imagem do pulmão de animais do grupo salina em (A), animais alérgicos desafiado com OVA em (B), animais alérgicos tratados com 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de NPs Au (C) e gráfico de quantificação da produção de muco no tecido pulmonar dos grupos avaliados em (D). As colunas e as barras verticais representam a média \pm E.P.M, respectivamente. ANOVA seguida do pós-teste de Tukey. + $P < 0,001$ (SAL vs. OVA) e *** $P < 0,001$ (OVA vs. OVA + NPs Au 60 $\mu\text{g}/\text{Kg}$). As setas indicam a presença de muco nos bronquíolos.

FONTE: Elaborado pelo autor.

A figura 7 demonstra a deposição de colágeno no tecido pulmonar revelado com o corante tricrômico de Gomori. A figura 7A demonstra o perfil de deposição de colágeno no tecido de animais alérgicos estimulados com salina. Na figura 7B nota-se um aumento na coloração azul referente à intensidade aumentada de colágeno depositado no tecido pulmonar.

Os animais alérgicos tratados com as NPs Au exibiram uma drástica redução na quantidade de colágeno depositado no tecido (Figura 7C). A figura 7D representa os valores em barras referente à quantificação de colágeno depositado por área de tecido (μm^2).

Figura 7 - Efeito das NPs Au sobre a deposição de fibras de colágeno no pulmão de animais alérgicos estimulados com OVA.



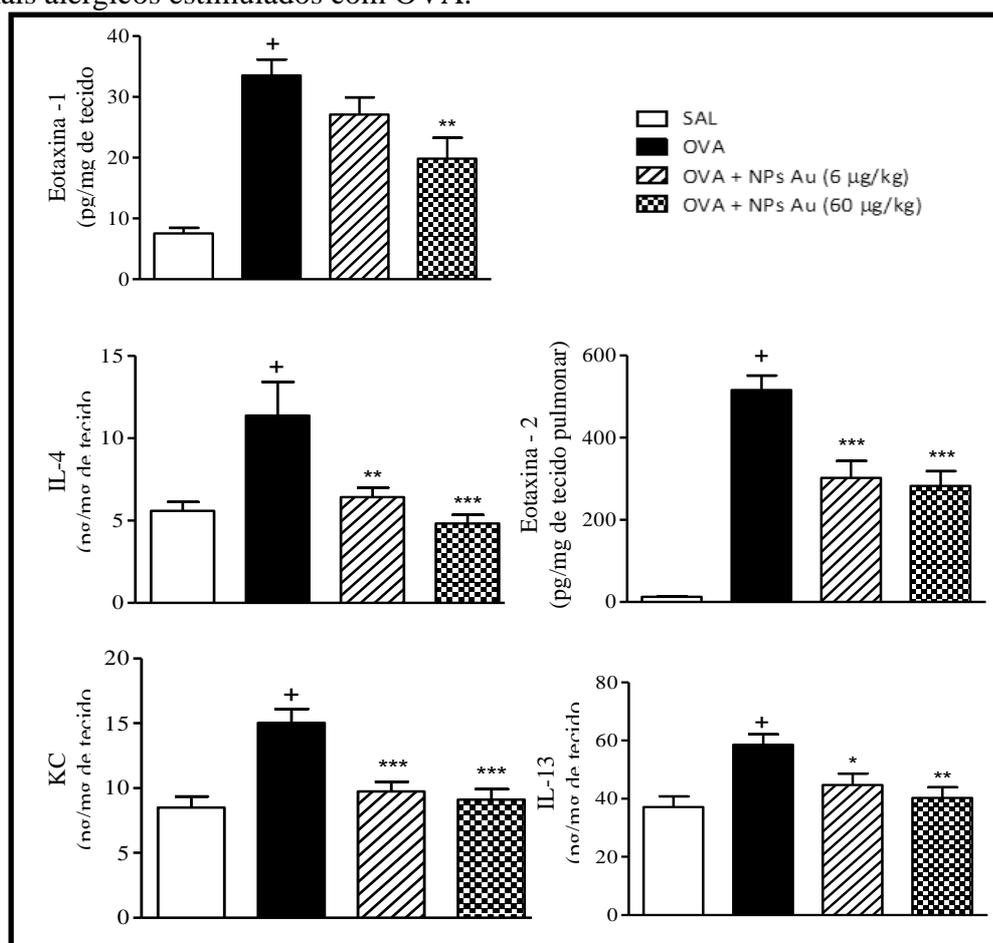
Fotomicrografia do pulmão corados com corante tricrômico de Gomori no aumento de 400X. Imagem do pulmão de animais do grupo salina em (A), animais alérgicos desafiado com OVA em (B), animais alérgicos tratados com 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de NPs Au em (C) e gráfico de quantificação da deposição de colágeno no tecido pulmonar dos grupos avaliados em (D). As colunas e as barras verticais representam a média \pm E.P.M, respectivamente. ANOVA seguida do pós-teste de Tukey. + $P < 0,001$ (SAL vs. OVA) e *** $P < 0,001$ (OVA vs. OVA + NPs Au 60 $\mu\text{g}/\text{Kg}$). A seta indica a deposição de colágeno na periferia do epitélio do bronquíolo.

FONTE: Elaborado pelo autor.

5.4 Efeito das nanopartículas de ouro sobre a produção de citocinas no tecido pulmonar

A figura 8 demonstra o conteúdo de citocinas pró-inflamatórias presente no tecido pulmonar. Pode ser observado que os animais alérgicos estimulados com OVA exibem um aumento significativo no conteúdo das citocinas (eotaxina-1, eotaxina-2, KC, IL-4 e IL-13) no tecido pulmonar, 48 h após o último estímulo alérgico, quando comparado aos animais desafiados com salina. O tratamento com NPs Au nos animais alérgicos desafiados com OVA atenuou significativamente os níveis de todas as citocinas avaliadas no tecido pulmonar ($p < 0,001$).

Figure 8 - Efeito das NPs Au na produção de citocinas pró-inflamatórias no tecido pulmonar de animais alérgicos estimulados com OVA.



As colunas representam a média \pm E.P.M. ANOVA seguida do pós-teste de Tukey. + $P < 0,001$ (SAL vs. OVA) e * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ (OVA vs. OVA + NPs Au 6 µg/Kg ou NPs Au 60 µg/Kg)

FONTE: Elaborado pelo autor.

5.5 Efeito das nanopartículas de ouro sobre a produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no tecido pulmonar

Com propósito de avaliar o perfil do estresse oxidativo no pulmão após o estímulo alergênico, amostras do tecido pulmonar foram processadas para quantificar malondialdeído (MDA), um produto final da peroxidação lipídica que foi revelado pela quantidade de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Nesta análise, verificamos que os níveis de TBARS no pulmão de animais alérgicos desafiados com OVA apresentaram-se elevados ($100,5 \pm 3,8$ nmol/ mg de proteínas; média \pm E.P.M.), quando comparados ao grupo salina ($71,4 \pm 2,4$ nmol/mg; média \pm E.P.M.) ($P < 0,001$). Animais alérgicos tratados com NPs Au apresentaram redução no estresse oxidativo no tecido pulmonar por atenuar a produção de TBARS ($84,8 \pm 1,7$ nmol/ mg; média \pm E.P.M.) ($P < 0,01$).

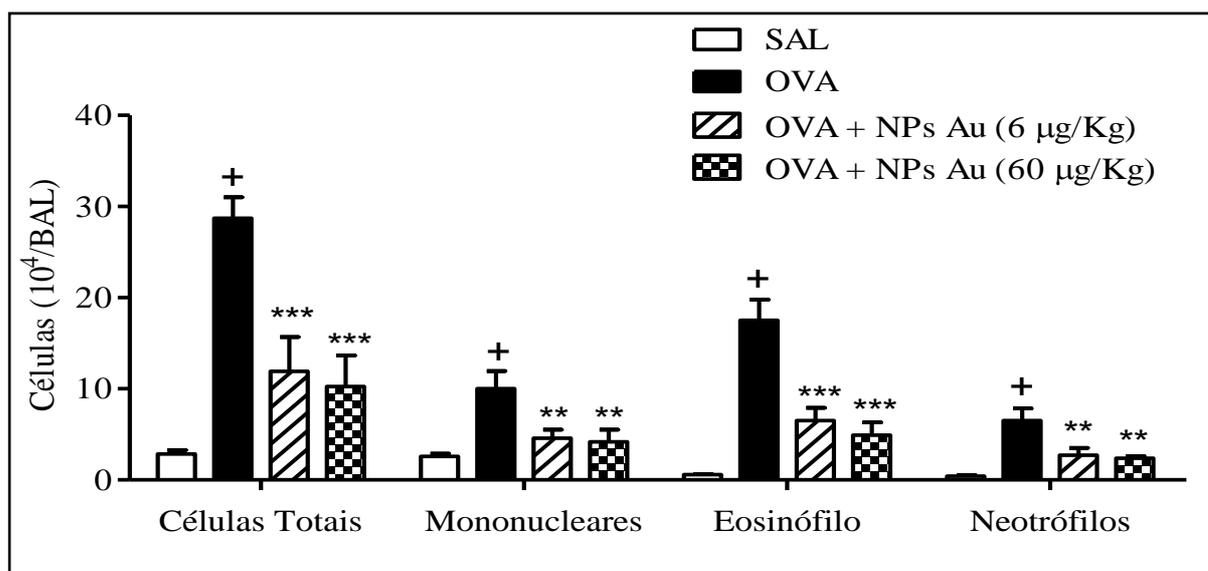
Tabela 1 - Quantificação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico no tecido pulmonar

Grupo (n=6)	TBARS (nmol de MDA/mg de proteína)
Salina	$71,4 \pm 2,4$
Ovalbumina	$100,5 \pm 3,8$
Ovalbumina + NPs Au (60 μ g/Kg)	$84,8 \pm 1,7$

5.6 Efeito das nanopartículas de ouro sobre a resposta inflamatória alérgica em camundongos

A figura 9 mostra o resultado da contagem total e diferencial de leucócitos presentes no BAL dos animais asmáticos após estímulo com OVA. Os animais expostos a OVA apresentaram, após 48 h, um aumento significativo no número de células totais e diferenciais em relação ao grupo estimulado apenas com salina. O tratamento com as NPs Au (6 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ e 60 $\mu\text{g}/\text{Kg}$), antes de cada estímulo antigênico atenuou significativamente o infiltrado total de leucócitos, bem como a quantidade de células mononucleares, neutrófilos e principalmente eosinófilos no BAL ($p < 0,01$).

Figura 9 - Efeito das NPs Au sobre o acúmulo de células inflamatórias no BAL de animais alérgicos estimulados com OVA.



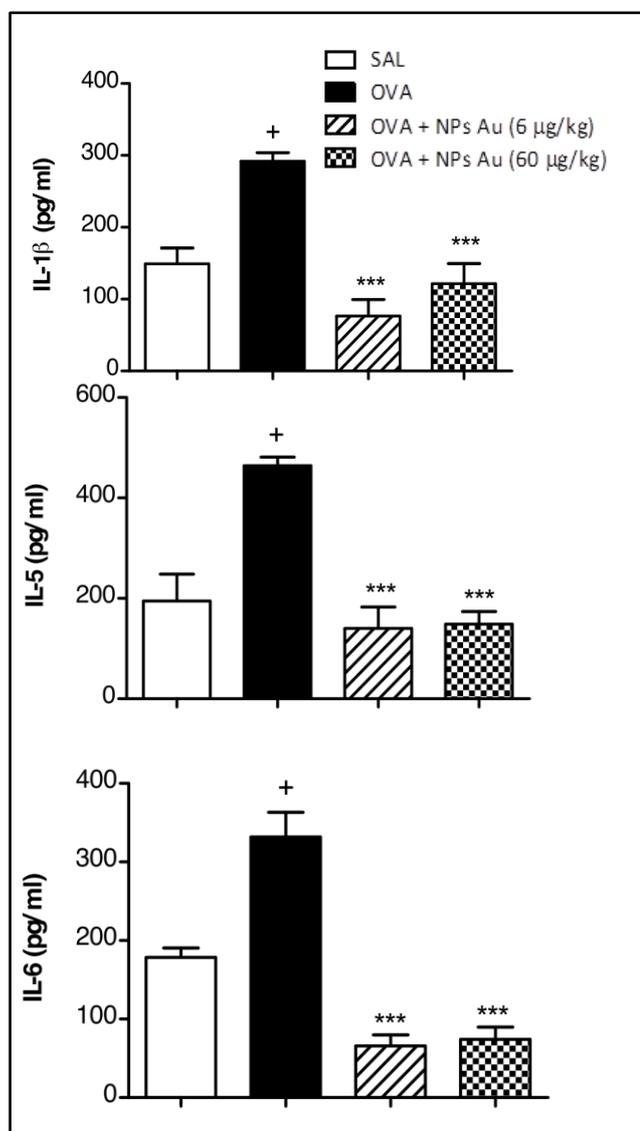
As colunas representam a média \pm E.P.M. ANOVA seguida do pós teste de Tukey. + $P < 0,001$ (SAL versus OVA); ** $P < 0,01$ (OVA vs. OVA + NPs Au 6 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) e *** $P < 0,001$ (OVA vs. OVA + NPs Au 60 $\mu\text{g}/\text{Kg}$).

FONTE: Elaborado pelo autor.

5.7 Efeito das nanopartículas de ouro sobre a produção de citocinas no lavado broncoalveolar

Os níveis das citocinas IL-1 β , IL-5, e IL-6 no BAL mostraram-se aumentados nos animais alérgicos após 48 h do último estímulo com OVA quando comparados ao grupo estimulado apenas com salina (Figura 10). O tratamento com as NPs Au nos animais alérgicos estimulados com OVA reduziu significativamente os níveis das citocinas no BAL ($p < 0,001$).

Figure 10 - Efeito das NPs Au sobre o conteúdo de citocinas pró-inflamatórias no BAL dos animais alérgicos estimulados com OVA.



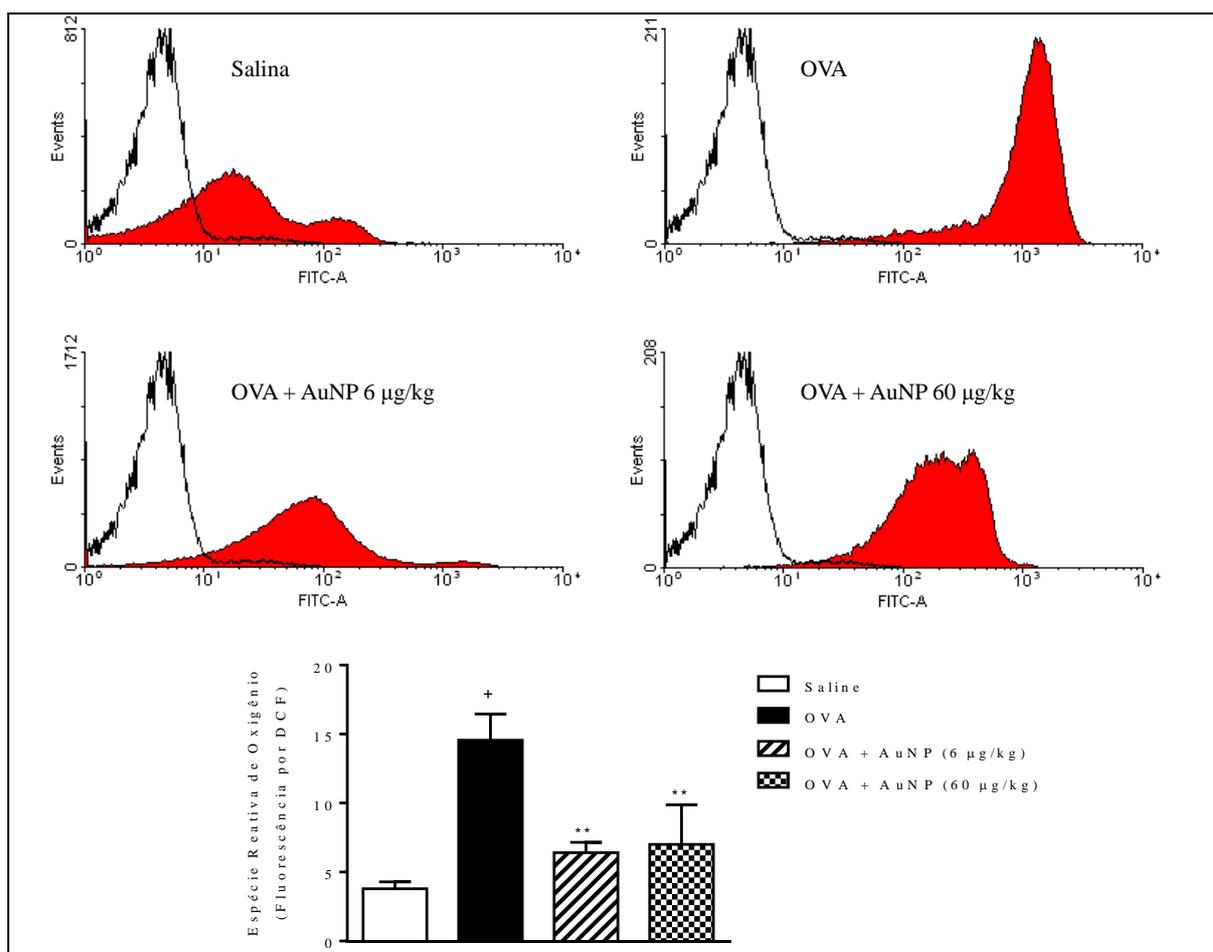
As colunas representam a média \pm E.P.M. ANOVA seguida do pós-teste de Tukey. + $P < 0,001$ (SAL vs. OVA) e *** $P < 0,001$ (OVA vs. OVA + NPs Au 6 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) ou (OVA vs. OVA + NPs Au 60 $\mu\text{g}/\text{Kg}$).

FONTE: Elaborado pelo autor.

5.8 Efeito das nanopartículas de ouro sobre a produção de ERO em células do lavado broncoalveolar

Após o estímulo intranasal com OVA nos animais sensibilizados, as células totais obtidas do BAL apresentaram uma quantidade significativamente maior de ERO do que as células recuperadas dos animais estimulados com salina (Figuras 11A e 11B). O tratamento com as NPs Au, nas duas doses testadas, foi capaz de atenuar a produção de ERO nos animais estimulados com OVA (Figuras 11C e 11D). A figura 11E representa os valores em barras da produção de ERO nos grupos.

Figura 11 - Efeito das NPs Au na geração intracelular de espécies reativas oxigenadas em células do lavado broncoalveolar.



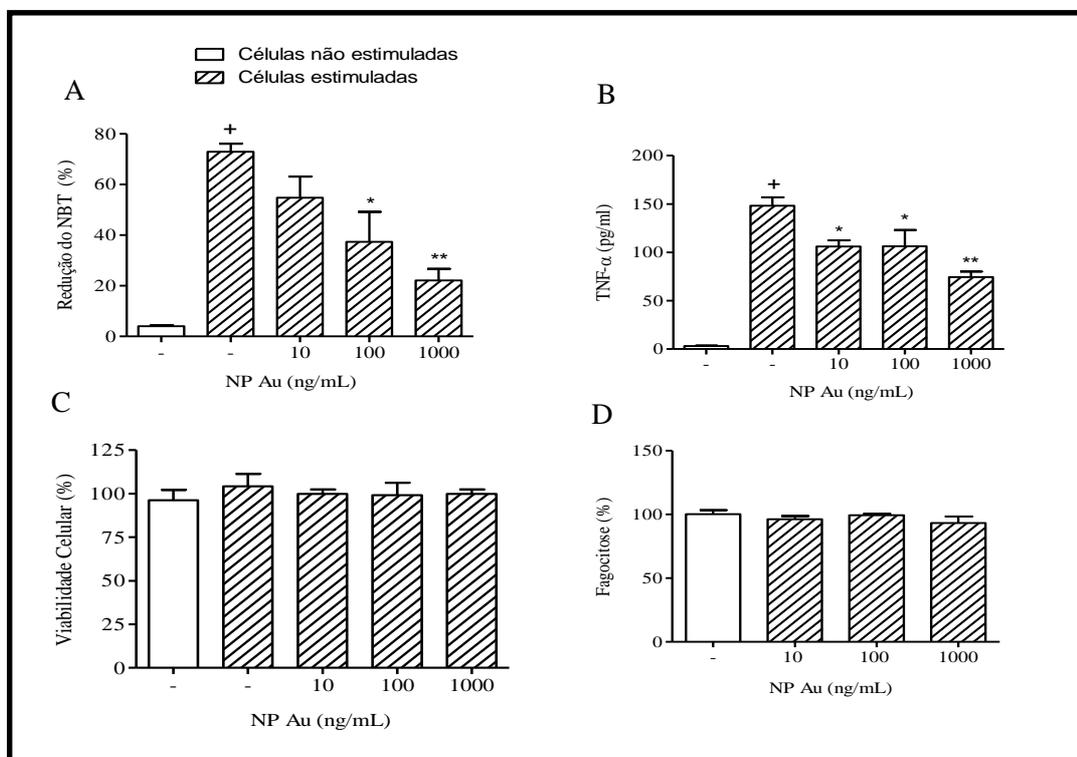
Na figura 11E, as colunas representam a média \pm E.P.M. da intensidade de fluorescência das células expostas ao DCF. ANOVA seguida do pós teste de Tukey. + $P < 0,001$ (SAL vs. OVA) e ** $P < 0,01$ (OVA vs. OVA + NPs Au 6 µg/Kg ou NPs Au 60 µg/Kg).

FONTE: Elaborado pelo autor.

5.9 Efeito das nanopartículas de ouro sobre a ativação de macrófagos *in vitro*

A Figura 12 demonstra o perfil de resposta de macrófagos peritoneais frente ao estímulo com zimosan, onde se avaliou a produção intracelular de ERO, a quantidade de TNF- α produzido, o índice de fagocitose e a viabilidade celular. Podemos observar que as células estimuladas com zimosan exibiram um aumento significativo na produção de ERO (Figura 12A) e na geração de TNF- α (Figura 12B). Entretanto, os macrófagos expostos por 24 h as NPs Au nas concentrações de 10, 100 e 1000 ng/ml exibiram uma significativa redução na geração de ERO, bem como na produção de TNF- α quando comparado ao controle estimulado (Figura 12A e 12B). Cabe destacar ainda que a inibição nesses parâmetros causados pelo tratamento das células com as NPs Au não foi promovida pela redução na viabilidade (Figura 12C), muito menos pela redução na capacidade fagocítica dessas células (Figura 12D).

Figura 12 - Efeito das NPs Au na produção de ERO (A), na secreção de TNF- α (B) na viabilidade celular (C) e na fagocitose em macrófagos ativados com zimosan A (D).



As colunas representam a média \pm E.P.M., ANOVA seguida do pós teste de Tukey. +P<0,001 (controle com células estimuladas vs. não estimuladas) e *P < 0,05 (controle com células estimuladas vs. células estimuladas com 10 ng/mL ou 100 ng/mL) e **P < 0,01 (controle com células estimuladas vs. células estimuladas com 1000 ng/mL).

FONTE: Elaborado pelo autor.

6 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que a instilação intranasal das NPs Au foi capaz de modificar diversos parâmetros da resposta inflamatória alérgica induzida por alérgeno nas vias aéreas de camundongos sensibilizados, sendo esse tratamento capaz de: inibir o infiltrado inflamatório para as vias aéreas e para o pulmão; inibir a produção de diferentes mediadores pró-inflamatórios; atenuar a hiperresponsividade brônquica; e suprimir a deposição de colágeno; a produção de muco e o estresse oxidativo nas células inflamatórias e no tecido pulmonar.

A síntese das NPs Au seguiu a metodologia de redução por citrato de sódio, visto que na literatura é reportado como o método de mais fácil execução, baixo custo, facilidade na modificação da superfície e ainda é capaz de estabilizar a solução coloidal evitando a agregação das NPs Au (MELO et al., 2012; RANA et al., 2011). Para entender as aplicações biomédicas das nanopartículas é importante conhecer as características físicas desta nanoestrutura para compreender suas potenciais interações com os sistemas biológicos. Assim, a microscopia eletrônica de transmissão mostra-se como uma ferramenta importante para determinar a distribuição e o diâmetro das nanopartículas. Na caracterização das nanoestruturas utilizadas neste estudo foi verificado que as NPs Au apresentaram uma forma esférica com diâmetro médio de 13 nm, e com efeito de ressonância de plasmon de superfície na região de 530 nm, o que confirma a forma esférica e dispersas das nanoestruturas de ouro. O diâmetro médio das nanopartículas apresenta influência direta sobre suas propriedades físico-químicas e farmacocinéticas, devido ao envolvimento com o tempo de permanência no organismo, a velocidade que atravessam a barreira endotelial e no seu reconhecimento pelo sistema fagocitário (BERRY, 2009).

Em geral, as NPs Au têm sido definidas como não tóxicas. Entretanto, na literatura há diversos trabalhos discordantes deste aspecto, onde demonstram que a toxicidade deste nanomaterial depende de parâmetros como o tamanho, a forma, a carga da superfície e o estado de agregação ou de dispersão (FREESE et al., 2012; GOSENS et al., 2010; ZHANG et al., 2011; CHO et al., 2010; CHO et al., 2009; SADAUSKAS et al., 2009; LEWINSKI et al., 2008; CONNOR et al., 2005).

Um exemplo interessante da relação entre tamanho das NPs Au e suas propriedades biológicas foi demonstrado por Sonavane e colaboradores (2008) quando avaliaram a permeabilidade das nanopartículas de tamanhos distintos (15 nm, 102 nm e 198 nm) no

intestino e pele de ratos utilizando descrevendo que quanto menor o tamanho da nanopartícula maior o grau de permeabilidade percutânea.

A biodistribuição é outro aspecto relacionado à atividade biológica das nanopartículas por depender do tamanho e da forma das nanoestruturas. Para este racional, há trabalhos evidenciando o perfil de distribuição pelo organismo de nanoestruturas administradas por diferentes vias. No trabalho de Jong e colaboradores (2008) foi verificado que o tamanho das NPs Au esférica, influenciam seu acúmulo em tecidos específicos. Os autores verificaram que 24 horas após a administração intravenosa de nanopartículas de 10 nm ocorreu um acúmulo destas estruturas nos rins, fígado, baço, timo, testículo, coração, cérebro e pulmão. Entretanto, quando este mesmo experimento foi realizado utilizando nanopartículas de tamanhos maiores (50 nm, 100 nm e 250 nm) as nanoestruturas foram detectadas apenas no sangue, fígado e rins. Em nosso estudo, por utilizarmos nanopartículas de ouro de 13 nm, especulamos que estas nanoestruturas possam ter uma ampla distribuição pelo organismo mesmo quando administrada por via intranasal. Entretanto, estudos devem ser conduzidos a fim de demonstrar esta possibilidade.

A utilização de modelos experimentais capazes de reproduzir a resposta inflamatória observada em humanos tem sido de grande relevância para elucidação dos processos fisiopatológicos de diversas patologias, incluindo as doenças alérgicas pulmonares (RODRIGUES et al., 2012; OLMEZ et al., 2009). No presente estudo foi utilizado o modelo de asma alérgica em camundongos induzida por instilação intranasal de ovoalbumina em animais sensibilizados. Neste modelo, constatamos que o desafio alergênico nos animais sensibilizados desencadeou uma série de eventos celulares e moleculares relacionados à resposta inflamatória alérgica pulmonar. Dentre os parâmetros que reproduzem os aspectos fisiopatológicos da asma humana, podemos destacar o intenso infiltrado inflamatório, principalmente de eosinófilo para o tecido estimulado, secreção de mediadores pró-inflamatórios, hiperresponsividade e o remodelamento das vias aéreas.

Interessados em saber o efeito do tratamento com as NPs Au sobre a resposta inflamatória desencadeada por alérgeno nas vias aéreas, inicialmente avaliamos a celularidade e o conteúdo de mediadores presentes no BAL. Assim, demonstramos que o tratamento intranasal com NPs Au nos animais alérgicos estimulados com OVA reduziu o infiltrado de células inflamatórias no BAL, em especial a população de eosinófilos, e a produção de mediadores pró-inflamatórios como IL-1 β , IL-5 e IL-6. Sustentando estes resultados, foi demonstrado que as NPs Au mostram-se capazes de inibir a migração celular e reduzir os níveis de TNF- α e IL-1 β (OLIVEIRA et al., 2011). Cabe ainda mencionar que nas respostas

de origem alérgica, a presença de IL-5 no sítio inflamatório exibe relevância para ativação eosinofílica (YAMAGUCHI et al., 1988), e que em nosso estudo, as NPs Au reduziram a produção deste mediador. Sendo assim, considerando que agentes capazes de reduzir a produção de mediadores pró-inflamatórios destacam-se como potenciais agentes terapêuticos a serem usados como anti-inflamatórios, as NPs Au se encaixam neste perfil de ações anti-inflamatórias.

Além disso, constatamos que leucócitos recuperados do BAL dos animais expostos ao alérgeno e tratados com as NPs Au exibiram uma redução na geração de ERO. Achados da literatura revelam que estresse oxidativo mostra-se um fator determinante para a perpetuação da inflamação alérgica (LEE et al., 2012; SIMKÓ et al., 2011). Logo, é possível sugerir que o tratamento utilizando as NPs Au possa atenuar a intensidade da resposta inflamatória por inibir parâmetros pró-inflamatórios, em especial o estresse oxidativo. Neste sentido, as NPs Au têm sido alvo de intensas investigações no sentido de elucidar o seu papel como agente terapêutico. Em sintonia com nossos achados, estudos têm demonstrado que o tratamento com as NPs Au induzem importantes efeitos anti-inflamatórios em diferentes modelos animais (TSAIE et al., 2013), incluindo efeitos anti-angiogênicos, inibição do dano oxidativo do DNA e redução na sinalização via NF- κ B (PEREIRA et al., 2012).

Considerando as possíveis repercussões relativas à toxicidade inerente ao uso destas nanopartículas pelas vias aéreas, podemos observar que estudos anteriores realizados por Gonsens e colaboradores (2010) revelaram que o uso de nanopartículas semelhantes as empregadas neste estudo não exibiram níveis de toxicidade. Neste referido trabalho, os autores demonstraram que a instilação de NPs Au esféricas de 50 nm induziram alterações teciduais relacionados a danos no tecido pulmonar. Além disso, Zhang e colaboradores (2010) demonstraram que a administração de NPs Au com 13,5 nm de diâmetro não promoveu efeitos tóxicos em ratos.

Com intuito de avaliar se estas alterações observadas nas vias aéreas após estimulação alérgica são capazes de gerar repercussões no tecido pulmonar, avaliamos a hiperreatividade das vias aéreas nos animais alérgicos estimulados com OVA e tratados com as NPs Au. Nossos resultados revelaram que os animais alérgicos estimulados com OVA e expostos às concentrações crescentes de metacolina exibiram uma intensa hiperresponsividade brônquica (HRB) quando avaliados os parâmetros de resistência e de elastância pulmonar. O tratamento com as NPs Au foi capaz de restaurar à níveis basais os valores de resistência e elastância pulmonar, demonstrando a importância deste tratamento para a melhora da função pulmonar. Essa constatação de melhoria na função pulmonar pode

estar relacionada com a atenuação de outras variáveis como a diminuição da inflamação local e atenuação da deposição de constituintes de matriz extracelular, visto que tanto a inflamação quanto a deposição de colágeno no tecido provocam estreitamento das vias aéreas o que prejudica o fluxo de ar, provocando a HRB e a piora da função pulmonar (LEUPPI, 2014).

Diferentes autores demonstraram que a reversão do remodelamento das vias aéreas e a atenuação da resposta inflamatória pulmonar têm sido vista como importantes aspectos a serem considerados durante o tratamento da asma, em especial quando se objetiva a redução da obstrução brônquica (YUAN et al., 2011). No presente estudo, para avaliar o perfil inflamatório do tecido pulmonar após estimulação com alérgeno, amostras do pulmão foram obtidas e submetidas ao processamento histológico para posterior coloração com Sirius Red Llewellyn's, PAS e tricômio de Gomori para avaliação da presença de eosinófilo no tecido, conteúdo de muco e de colágeno, respectivamente. Nossos resultados revelaram que o tratamento com as NPs Au foi capaz de atenuar as alterações provocadas por OVA, tais como acúmulo de eosinófilos no parênquima pulmonar, bem como redução drástica da produção de muco e deposição de colágeno.

Analizamos ainda o conteúdo de citocinas pró-inflamatória produzida no pulmão após estimulação alérgica, e verificamos que os níveis de eotaxina-1, eotaxina-2, KC, IL-4 e IL-13 estavam significativamente aumentados no tecido pulmonar e que o tratamento com as NPs Au reduziu os níveis de todas essas citocinas. Tais citocinas, são importantes agentes reguladores da expressão gênica de diferentes mediadores envolvidos na regulação do processo inflamatório, em especial em eventos de proliferação, sobrevivência e maturação de eosinófilos. Portanto, aliado aos resultados anteriores, o tratamento com as NPs Au parece ser responsável pela supressão de vários parâmetros diretamente relacionados com a hiperresponsividade brônquica. Assim, acreditamos que tais efeitos tenham repercutido na mecânica respiratória, visto que verificamos uma redução da resistência e da elastância pulmonar.

Considerando os efeitos antioxidantes observados pelas NPs Au sobre as células do BAL dos animais estimulados por antígeno, buscamos compreender seus efeitos no tecido pulmonar. Assim, avaliamos o conteúdo de malondialdeído pela quantificação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Assim, constatamos que o tratamento com as NPs Au foi capaz de inibir o conteúdo de TBARS no pulmão dos animais alérgicos estimulados com OVA, confirmando o envolvimento de mecanismos antioxidativos envolvidos nas ações anti-inflamatórias das NPs Au. Esta característica das NPs Au em reduzir o estresse oxidativo não se mostra restrito ao nosso modelo, visto que Victor e

colaboradores (2012) demonstraram recentemente que o uso de NPs Au esférica de 25 nm de diâmetro em lesões musculares traumáticas atenua a lesão muscular por reduzir a produção de ERO e a expressão de TNF- α e IL-1 β .

Na tentativa de avançar com estudos e revelar um potencial alvo celular para as ações das NPs Au, foi utilizado o modelo de cultura de células para avaliar o efeito das NPs Au *in vitro* sobre macrófagos. Os macrófagos são importantes células do tecido pulmonar, não apenas por estar em grande número nesse tecido, mas também por participar das respostas imunes inatas e adaptativas, e por serem importantes fontes de mediadores como o TNF- α e a IL-13, sendo este último um mediador de grande relevância para a resposta alérgica. Neste contexto, diferentes trabalhos mostram que a ativação de macrófagos alveolares por citocinas Th2 resulta na exacerbação da resposta inflamatórias alérgica, inflamação nas vias aéreas e fibrose pulmonar (FEOLA et al., 2010; WYNT, 2004)

Neste mesmo racional, em nosso trabalho conduzimos ainda experimentos *in vitro* utilizando macrófagos peritoneais estimulados com zimosan A como modelo de ativação celular. Neste sistema, verificamos que a exposição dos macrófagos as NPs Au por 24 h foi capaz de reduzir a produção de ERO, bem como a produção de TNF- α . Esses resultados, além de exibir sintonia com nossos dados *in vivo*, também estão em consonância com outros trabalhos que revelam o potencial antioxidante das nanopartículas metálicas por agirem como agentes quelantes de radicais livres, incluindo ERO, peróxido de hidrogênio e ânions superóxidos (NIE et al., 2007; KAJITA et al., 2007). Vale destacar também que apesar destas nanoestruturas interferirem com a geração de espécies reativas e TNF- α , as NPs Au não modificaram o perfil fagocítico dos macrófagos, e nem induzir a morte celular, o que torna essas nanoestruturas muito atrativas como agentes terapêuticos por agirem em sistemas específicos de ativação celular.

Os macrófagos mostram-se alvos de grande relevância para que as NPs Au possam ser utilizadas como agentes anti-inflamatórios. Estudos recentes demonstraram que os macrófagos alveolares são importantes sítios de acúmulo de nanopartículas quando estas são administradas por via intranasal (KHLEBTSOV; DYKMANA, 2011). Assim, além das NPs Au exibirem efeitos anti-inflamatórios intrínsecos, estas nanoestruturas ainda podem funcionar como carreadores de agentes farmacologicamente ativos que tenham o macrófago como alvo celular. Recentemente, Geiser e colaboradores (2013) investigando a captura de NPs Au (21 nm) por macrófagos no modelo de doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), verificaram que as células do epitélio alveolar tipo I, e principalmente, os macrófagos alveolares eram capazes de realizar um rápido clearance das nanopartículas aerolizadas,

sustentando que as NPs Au podem ser uma valiosa opção para nanocarreamento de fármacos direcionados a DPOC.

Portanto, as NPs Au possuem potencial anti-inflamatório por atenuar diversos parâmetros fisiopatológicos típicos das inflamações alérgicas, podendo ser uma estratégia relevante para a terapia da asma.

7 CONCLUSÕES

Com a realização deste estudo conclui-se que:

- ✓ As nanopartículas de ouro sintetizadas e utilizadas nos ensaios biológicos apresentaram forma esférica com diâmetro médio de 13 nm em solução coloidal;
- ✓ O tratamento prévio por via nasal com as nanopartículas de ouro inibiu a hiperresponsividade brônquica induzida pelo estímulo alérgico em animais asmáticos;
- ✓ O tratamento prévio por via nasal com as nanopartículas de ouro atenuou as alterações histopatológicas no pulmão desencadeado pelo estímulo alérgico em animais asmáticos;
- ✓ O tratamento prévio por via nasal com nanopartículas de ouro inibiu o infiltrado de células inflamatórias nas vias aéreas, bem como a produção de citocinas pró-inflamatórias induzida pelo estímulo alérgico em animais asmáticos;
- ✓ As nanopartículas de ouro inibiram a produção de ERO em células do BAL, bem como reduziram a produção de TBARS no parênquima pulmonar de animais alérgicos estimulados com antígeno;
- ✓ *In vitro*, as nanopartículas de ouro inibiram a produção de TNF- α e ERO em macrófagos ativados sem interferir com a habilidade fagocítica ou mesmo com a viabilidade dessas células.

Em conjunto, nossos resultados nos permitem concluir que o tratamento local com as nanopartículas de ouro previne a reação inflamatória alérgica das vias aéreas e pulmão desencadeada por antígeno no modelo experimental de asma em camundongos.

REFERÊNCIAS

- Abraham, G.E.; Himmel P.B. Gold Nanoparticles in Biology and Medicine: Recent Advances and Prospects. **Acta Naturae**, v. 7, p. 295-305, 1997.
- Adams, W.W.; Baughman, R. H. Richard E. Smalley (1943-2005), **Science AAAS**, p. 1916, 2005.
- Barnes, P. J. Corticosteroids: The drugs to beat. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 533, p. 2-14, 2006.
- Bel, E. H. Clinical phenotypes of asthma. **Curr. Opin. Pulm. Med.**, v. 10, p. 44-50, 2004.
- Berry, C. C. Progress in functionalization of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. **J. Phys. Appl.**, v. 36, n.13, p. 198-206, 2009.
- Blakey, J.D., Zaidi, S, Shaw, D.E. Defining and Managing Risk in Asthma. **Clin. Exp. Allergy**, p. 1-26, 2014.
- Boisselier E.; Astruc D. Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics ,therapies and toxicity, **Chem. Soc. Rev.**, v. 38, p.1759-1782, 2009.
- Brasil - Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Ações Básicas. Estatísticas de saúde e mortalidade. Brasília: Ministério da Saúde; 2005.
- Buzea, C.; Blandino, I. P. I.; Robbie, K. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity, **Biointerphases**, v. 2, n. 4, p. 1-103, 2007.
- Callister, W.D. Materials Science and Engineering An Introduction, 7º Edição, editora, John Wiley & Sons, Inc. 2005.
- Campbell, F.C. Structural Composite Materials, **ASM International**, 2010.
- Campo, P. Phenotypes and Endotypes of Uncontrolled Severe Asthma: New Treatments. **J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.**, v. 23, n. 2, p. 76-88, 2013.
- Casagrande, R. R. D. Pastorino, A. C.; Souza, R. G. L.; Leone, C.; Solé, D.; Jacob, C. M. A. Prevalência de asma e fatores de risco em escolares da cidade de São Paulo. **Rev. Saúde Pública**, v. 42, n. 3, p. 517-523, 2008.

Cho, W.S.; Cho, M.; Jeong, J.; Choi, M.; Han, B.S.; Shin, H.S.; Hong, J.; Chung, B.H.; Jeong, J.; Cho, M.H. Size-dependent tissue kinetics of PEG-coated gold nanoparticles. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 15, n. 245, p. 116-23, 2010.

Cho, W. S.; Cho, M.; Jeong, J.; Choi, M.; Cho, H. Y.; Han, B. S.; Kim, S. H, Kim, H. O.; Lim, Y. T.; Chung, B. H.; Jeong, J. Acute toxicity and pharmacokinetics of 13 nm-sized PEG-coated gold nanoparticles. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 236, n. 1, p. 16-24. 2009.

Chung K. F. Defining phenotypes in asthma: a step towards personalized medicine. **Drugs.**, v. 74, n. 7, p. 719-28. 2014.

Chung, K. F.; Barnes, P. J. Cytokines in asthma. **Thorax.**, v. 54, p. 825-857, 1999.

Connor, E. E.; Mwamuka, J.; Gole, A.; Murphy, C. J.; Wyatt, M. D. Gold Nanoparticles Are Taken Up by Human Cells but Do Not Cause Acute Cytotoxicity, **Small.** v. 1, n. 3, p. 325-7, 2005.

Conrad M. L.; Yildirim, A. O.; Sonar, S. S.; Kiliç, A.; Sudowe, S.; Lunow, M.; Teich, R.; Renz, H.; Garn, H. Comparison of adjuvant and adjuvant-free murine experimental asthma models. **Clin. Exp. Allergy.**, v. 39, n.8, p. 1246–1254, 2009.

Cunha-Filho, M. S. S.; Sá-Barreto, L. C. L. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 28, p. 1, 2007.

Daly, T.; Royal, R. E.; Kershaw, M. H.; Treisman, J.; Wang, G.; Li, W.; Herlyn, D.; Eshhar, Z.; Hwu, P. Recognition of human colon cancer by T cells transduced with a chimeric receptor gene. **Cancer Gene Ther.** v. 7, n. 2, p. 284-91, 2000.

D'Emanuele, A.; Attwood D. Dendrimer–drug interactions. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 57, p. 2147-2162, 2005.

Elias, J.A.; Lee, C. G.; Zheng T.; Ma B.; Homer J. R.; Zhu Z. New insights into the pathogenesis of asthma. **J. Clin. Invest.**, v. 111, p. 291-297, 2003.

Elias J.A.; Zhu, Z. Chupp, G.; Homer R.J. Airway remodeling in asthma. **J. Clin. Invest.**, v. 04, p.1001–1006, 1999.

EPA United States Environmental Protection Agency. Disponível em:

<http://www.epa.gov/nanoscience/quickfinder/nanomaterials.htm> Acesso em: 10 jan. 2014.

Faraday, M. The Bakerian Lecture: Experimental Relations of Gold (and Other Metals) to Light. **Phil. Trans. R. Soc. Lond.**, v. 147, p. 144-181, 1857.

Fahmy, T. M. Fong P. M.; Park J.; Constable, T.; Saltzman, W. M. Nanosystems for Simultaneous Imaging and Drug Delivery to T Cells. **The AAPS Journal**, v. 9, n. 2, 2007.

Feola, D. J. Garvy, B.A.; Cory, T.J.; Birket, S.E.; Hoy, H.; Hayes, D. Jr.; Murphy, B.S. Azithromycin alters macrophage phenotype and pulmonary compartmentalization during lung infection with *Pseudomonas*. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 54, p. 2437-2447, 2010.

Fernandes, M. F. M.; Filgueiras C. **Quim. Nova**, v. 31, n. 8, p. 2205-2213, 2008.

Ferreira, H. S.; Rangel, M. C. nanotecnologia: aspectos gerais e potencial de aplicação em catálise, **Quim. Nova**, v. 32, n. 7, p. 1860-1870, 2009.

Freese, C. Uboldi, C.; Gibson, M. I.; Unger, R.E.; Weksler, B.B.; Romero, I.A.; Couraud, P. O., Kirkpatrick, C.J. Uptake and cytotoxicity of citrate-coated gold nanospheres: Comparative studies on human endothelial and epithelial cells. **Part. Fibre Toxicol.**, v. 3, n. 9, p. 9-23, 2012.

Galembeck F.; Costa, C. A. R.; Burgo, T. A. L. Bernardes, J. S. Gouveia, R. F. Microscopia de sondas: uma caixa de ferramentas da nanotecnologia. *nanotecnologias/artigos* p. 37-43, 2013.

Geiser, M.; Quaile, O.; Wenk, A.; Wigge, C.; Eigeldinger-Berthou, S.; Hirn, S.; Schäffler, M, Schleh, C.; Möller, W.; Mall, M. A.; Kreyling, W.G. Cellular uptake and localization of inhaled gold nanoparticles in lungs of mice with chronic obstructive pulmonary disease. **Part Fibre Toxicol.**, v. 10, n. 19, p. 1-10, 2013.

Gibson, M. I.; Danial M.; Klok, H. A. Sequentially modified, polymer-stabilized gold nanoparticle libraries: convergent synthesis and aggregation behavior. **ACS Com. Sci.**, v. 9, n. 13, p. 286-97, 2011.

Global initiative for Asthma (GINA)/NHLBI/WHO <<http://ginasthma.org/>> disponível em: agosto de 2013.

Gosens, I. Post, J. A.; Fonteyne, L.J.; Jansen, E. H.; Geus, J. W.; Cassee, F. R.; Jong, W. H. Impact of agglomeration state of nano- and submicron sized gold particles on pulmonar Inflammation, **Part. Fibre Toxicol.**, v.2, n.7, p. 1-11, 2010.

Han, K., Kim, H. Kim, J. Kwon, Y. H. Lee, C. K. Lee, Y. Song, S. J. Lee, N. Ha, K. Kim, Auranofin inhibits overproduction of pro-inflammatory cytokines, cyclooxygenase expression and PGE2 production in macrophages. **Arch. Pharm. Res.**, v. 31, p. 67-68, 2008.

Hansbro P. M.; Kaiko G.E., Foster P.S. Cytokine/anti-cytokine therapy - novel treatments for asthma?. **Br J Pharmacol.** v. 163, n.1, p. 81-95, 2011.

Holgate, S. T. Innate and adaptive immune responses in asthma. **Nat. med.** v. 18, n. 5, p. 673-683, 2012.

Holgate, S.T. Pathogenesis of asthma. **Clin. Exp. Allergy**, v. 38, n. 6, p. 872-897, 2008.

Horvath, H. Gustav Mie and the scattering and absorption of light by particles: Historic developments and basics. **J. Quant. Spectros. Rad. Trans.**, v. 110, p. 787-79, 2009.

Hoshinoe, T. Okamoto, M.; Takei, S.; Sakazaki, Y.; Iwanaga T.; Aizawa, H. Redox-regulated mechanisms in asthma. **Antioxid. Redox Signaling**, v.10, n. 4, p. 769-783, 2008.

Hooijdonk V. E.; Bittencourt, C.; Snyders, R.; Colomer, J.F. Functionalization of vertically aligned carbon nanotubes. Beilstein **J. Nanotechnol.**, v. 4, p. 129-52, 2013.

Jana, N. R.; Gearheart, L.; Murphy, C. J. Evidence for seed-mediated nucleation in the chemical reduction of gold salts to gold nanoparticles. **Chem. Mater.**, v. 13, p. 2313-22, 2001.

Jeon, K. I.; Byun, M. S.; Jue, D. M. Gold compound auranofin inhibits I κ B kinase (IKK) by modifying Cys-179 of IKK β subunit. **Exp. Mol. Med.**, v. 35, p. 61-66, 2003.

Jong, W.H. Hagens, W.I.; Krystek, P.; Burger, M.C.; Sips, A.J.; Geertsma, R.E. Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration.

Biomaterials. v. 29, n. 12, p. 1912-9, 2008.

Jung, J. Y.; Lee, K.Y.; Lee, M. Y.; Jung, D.; Cho, E.S.; Son, H. Y. Antioxidant and antiasthmatic effects of saucerneol D in a mouse model of airway inflammation. **Int**

Immunopharmacol., v. 11, n. 6, p. 698-705, 2011.

Kamaly N. Xiao, Z.; Valencia, P. M.; Radovic-Moreno, A.F.; Farokhzad, O. C. Targeted polymeric therapeutic nanoparticles: design, development and clinical translation. **Chem.**

Soc. Rev. v. 7, n. 41, p. 2971-3010, 2012.

Kamani S.L.; Kamani, A. Material Science, ed. New Age International, 2006

Kajita, M. et al. Platinum nanoparticle is a useful scavenger of superoxide anion and hydrogen peroxide. **Free Radic. Res.**, v. 41, n. 6, p. 615-626, 2007.

Kawano, T.; Matsuse, H.; Tsuchida, T.; Fukahori, S; Fukushima, C.; Nishino, T.; Kohno, S. Cysteinyl leukotriene receptor antagonist regulates allergic airway inflammation in an organ- and cytokine-specific manner. **Med. Sci. Monit.**, v. 22, n. 20, p. 297-302, 2014.

Kim, T. H.; Lee, S. Chen, X. Nanotheranostics for personalized medicine. **Expert. Rev. Mol. Diagn.** v. 13, n. 3, p. 257-69, 2013.

Kim, C. "Engineering Surface Functionality of Gold Nanoparticles for Therapeutic Applications", University of Massachusetts , Dissertations, p. 523, 2012.

Kim, D. Park, S.; Lee, J. H.; Jeong, Y.Y.; Jon, S. Antibiofouling Polymer-Coated Gold Nanoparticles as a Contrast Agent for in Vivo X-ray Computed Tomography Imaging. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 129, n. 24, p. 7661-7665, 2007.

Kim, N. H.; Lee, M. Y.; Park, S. J.; Choi, J. S.; Oh, M. K.; Kim, I. S. Auranofin blocks IL-6 signalling by inhibiting phosphorylation of JAK1 and STAT3. **Immunology**, v. 122, p. 607-614, 2007.

Khlebtsov, N.; Dykmana, L. Biodistribution and toxicity of engineered gold nanoparticles: a review of in vitro and in vivo studies. **Chem. Soc. Rev.**, v. 40, p. 1647-1647, 2011.

Lanone, S.; Boczkowski, J. Titanium and gold nanoparticles in asthma: the bad and the ugly. **Eur Respir J.**, v. 37, n. 2, p. 225-7, 2011.

Lai-Kwan, C.; Chang, H. From Bioimaging to Biosensors: Noble Metal Nanoparticles in Biodetection, USA, Pan Stanford publishing, 2013.

Lechner, A. J.; Matuschak, G. M.; Brink, D. S. Pulmões: uma Abordagem Integrada à Doença. 1. ed. Porto Alegre: Mcgraw Hill, 2013.

Lee, C. W. Study of skin antiageing and antiInflammatory affects of dihydroquercetin, natural Triterpenoids, and their synthetic derivatives. **Rus. J. Bioorganic Chem.**, v. 38, n.3, p. 328-334, 2012.

Lee, K. S.; El-Sayed, M. A. Gold and silver nanoparticles in sensing and imaging: sensitivity of plasmon response to size, shape, and metal composition. **J. Phys. Chem. B.** v. 110, n. 39, p. 19220-5, 2006.

Lee, M. Y.; Lee, N. H, Seo, C. S; Lee, J. A.; Jung, D.; Kim, J. H.; Shin, H. K. Alpinia katsumadai seed extract attenuate oxidative stress and asthmatic activity in a mouse model of allergic asthma. **Food Chem. Toxicol.**, v. 48, n. 6, p. 1746-1752, 2010.

Lee D.W.; Shirley, S. A.; Lockey, R. F.; Mohapatra, S. S. Thiolated chitosan nanoparticles enhance anti-inflammatory effects of intranasally delivered theophylline. **Respir. Res.**, v. 7, n.1, p.112, 2006.

Lee, C. C.; MacKay, J. A.; Fréchet, J. M. J. Designing dendrimers for biological applications. **Nature Biotechnology**, v. 23, n. 12, 2005.

Levy, R. Thanh, N.T.; Doty, R.C.; Hussain, I.; Nichols, R. J.; Schiffrin, D. J.; Brust, M.; Fernig, D. G. Rational and combinatorial design of peptide capping ligands for gold nanoparticles. **J. Am. Chem. Soc.**, v.126, n.32, p.10076-84, 2004.

Leuppi, J.D.; Ott, S.R. Management of an acute exacerbation of asthma and COPD. **Ther. Umsch.** v. 71, n. 5, p. 289-93, 2014.

Lewinski, N.; Colvin, V.; Drezek, R.; Cytotoxicity of Nanoparticles. **Small.** v. 4, n. 1, p. 26-49, 2008.

Loiarro, M; Ruggiero, V; Sette, C. Targeting TLR/IL-1R signalling in human diseases. **Mediators Inflamm.**, p. 1-12, 2010.

Quina, F.H. Nanotecnologia e o meio ambiente: perspectivas e riscos. **Quim. Nova**, v. 27, n. 6, p. 1028-1029, 2004.

Markowska, K.; Grudniak, A. M.; Wolska, K.I. Silver nanoparticles as an alternative strategy against bacterial biofilms. **Acta Biochim Pol.**, v. 60, n. 4, p. 523-30, 2013.

Martins, P. Nanotecnologia e meio ambiente para uma sociedade sustentável, **Estud. Soc** v. 17, n. 34, p. 294-310, 2009.

Masotti, A.; Caporali, A. Preparation of magnetic carbon nanotubes (Mag-CNTs) for biomedical and biotechnological applications. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 18, n. 14, 2013.

Mehtae, A. K.; Arora, N. S.; Gaur, N.; Singh, B. P. Choline supplementation reduces oxidative stress in mouse model of allergic airway disease. **Eur. J. Clin. Invest.**, v. 39, n. 10, p. 934-941, 2009.

Melo, M. A.; Santos, L. S. S; Gonçalves, M. C.; Nogueira, A. F. Preparação de nanopartículas de prata e ouro: um método simples para a introdução da nanociência em laboratório de ensino, **Quim. Nova**, v. 35, n. 9, p. 1872-78, 2012.

Miranda, P. E. V. O crescimento da área de Ciência dos Materiais. **Matéria**, v.15, n.4, 2010.
Ministério da Saúde. Brasil. Secretaria Nacional de Ações Básicas - SIH/SUS. Estatísticas de saúde e mortalidade. Brasília 2006.

Mitchell, B. S. An introduction to materials engineering and science: for chemical and materials engineers, John Wiley & Sons, Inc. 2003.

Mukherjee, P.; Bhattacharya, R.; Wang, P.; Wang, L.; Basu, S.; Nagy, J. A.; Atala, A.; Mukhopadhyay, D.; Soker, S. Antiangiogenic properties of gold nanoparticles. **Clin Cancer Res.**, v. 11, p. 3530-34, 2005.

Muthu, M.S.; Leong, D. T.; Mei, L.; Feng, S. S. Nanotheranostics - application and further development of nanomedicine strategies for advanced theranostics, **Theranostics**. v. 26, n. 4, p. 660-77, 2014.

Naik, E.; Dixit, V. M. mitochondrial reactive oxygen species drive proinflammatory cytokine production. **J. Exp. Med.**, v. 208, n. 3, p. 417-20, 2011.

Nie, Z.; Liu, K. J.; Zhong, C. J.; Wang, L. F.; Yang, Y.; Tian, Q.; Liu, Y. Enhanced radical scavenging activity by antioxidant-functionalized gold nanoparticles: a novel inspiration for development of new artificial antioxidants. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 43, n. 9, p. 1243-1254. 2007.

Olmez, D.; Babayigit, A.; Erbil, G.; Karaman, O.; Bagriyanik, A.; Yilmaz, O.; Uzuner, N. Histopathologic Changes in Two Mouse Models of Asthma. **J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.**, v. 19, n. 2, p. 132-138, 2009.

Oliveira, C. M. B.; Sakata, R. K.; Machado, Issy, A.; Gerola, L. R. Citocinas y Dolor, **Rev. Bras. Anesthesiol.**, v. 61, n. 2, p. 137-142, 2011.

Ortega, V.E. Pharmacogenetics of beta2 adrenergic receptor agonists in asthma management. **Clin. Genet.**, v. 86, n. 1, p. 12-20, 2014.

Park, H.S.; Kim, K. H.; Jang S.; Park, J. W.; Cha H. R.; Lee J. E.; Kim J. O.; Kim S. Y.; Lee C. S.; Kim, J. P.; Jung, S. S. Attenuation of allergic airway inflammation and hyperresponsiveness in a murine model of asthma by silver nanoparticles. **Int. J. Nanomedicine**. v. 9, n. 5, p. 505-15, 2010.

Park, J.; Lakes, R. S. Biomaterials An Introduction: Biomedical and Mechanical Engineering, 3° edição, 2007.

Pereira, D. V.; Petronilho, F.; Pereira, H. R.; Vuolo, F.; Mina, F.; Possato, J. C.; Vitto, M. F.; Souza, D. R.; Silva, L.; Silva P. M. M.; Souza, C. T.; Dal-Pizzol, F.; Effects of gold

nanoparticles on endotoxin-induceduve it is in rats. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 53, n. 13, p. 8036-8041, 2012.

Phoenix, C.; Drexler E. Safe exponential manufacturing. **Nanotechnology**, v. 15, p. 869-872, 2004.

Pitrez, P.M.; Stein, R.T.; Asthma in Latin America: the dawn of a new epidemic. **Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.**, v. 8, p. 378-83, 2008.

Rana, S.; Bajaj, A.; Mout, R.; Rotello, V.M. Monolayer coated gold nanoparticles for delivery applications. **Adv. Drug. Deliv. Rev.** v. 64, n. 2, p. 200-16, 2012

Reynaert, N.L et al. Catalase overexpression fails to attenuate allergic airways disease in the mouse. **J. Immunol.**, v. 178, n. 6, p. 3814-3821, 2007.

Ribeiro, J. D.; Toro, A. A. D. C.; Baracat, E. C. E. Antileucotrienos no tratamento da asma e rinite alérgica. **J. Pediatr.**, v. 82, n. 5, p. 213-219, 2006.

Rodrigues, A. M. Schmidt C. Z. P.; Gualdi, L. P.; Cao, R. G.; Souza, R. G.; Pereira, A. C.; Nuñez, N. K.; Schleich, A. P.; Pitrez, P. M. C. Proposta de um modelo murino de curta duração de resposta pulmonar alérgica aguda sem utilização de adjuvante. **J. Bras. Pneumol.**, v. 38, n. 5, p. 595-604, 2012.

Rose, M.C.; Nickola, T.J.; Voynow, J.A. Airway mucus obstruction: mucin glycoproteins, MUC gene regulation and goblet cell hyperplasia. **Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.**, v. 25, n. 5, p. 533-537, 2001.

Sadauskas, E. Jacobsen, N. R.; Danscher, G.; Stoltenberg, M.; Vogel, U.; Larsen, A.; Kreyling, W.; Wallin, H. Biodistribution of gold nanoparticles in mouse lung following intratracheal instillation. **Chem. Cent. J.** v. 20, p. 3-16. 2009.

Sanzhakov, M. A.; Ipatova O. M.; Torkhovskaia, T. I.; Prozorovskiĭ, V. N.; Tikhonova, E. G.; Druzhilovskaia, O. S.; Medvedeva, N. V. Nanoparticles as drug delivery system for antituberculous drugs. **Vestn. Ross. Akad. Med. Nauk.**, v. 8, p. 37-44, 2013.

- Salmaso, S.; Caliceti, P.; Amendola, V. Meneghetti, M. Magnusson, J. P.; Pasparakisc, G. Alexander, C. Cell up-take control of gold nanoparticles functionalized with a thermoresponsive polymer. **J. Mater. Chem.**, v. 19, p. 1608-15, 2009.
- Seeman, N. C. Nanomaterials Based on DNA, *Annu. Rev. Biochem.*, v. 79, p. 65-87, 2010.
- Serra, M. F; Anjos-Valotta, E. A.; Olsen, P. C.; Couto G. C.; Jurgilas, P. B.; Cotias, A. C.; Pão, C. R.; Ferreira, T. P.; Arantes, A.C.; Pires AL, Cordeiro RS, Silva, P. M.; Martins, M. A. Nebulized lidocaine prevents airway inflammation, peribronchial fibrosis, and mucus production in a murine model of asthma. **Anesthesiology**, v. 117, n. 7, p. 580-590, 2012.
- Shah, Z.A.; Vohora, S.B. Antioxidant/Restorative Effects of Calcined Gold Preparations Used in Indian Systems of Medicine against Global and Focal Models of Ischaemia. **Pharmacol. toxicol.**, v. 90, p. 254-259. 2002.
- Shi, P.; Gustafson, J. A.; MacKay J. A. Genetically engineered nanocarriers for drug delivery. **Int. J. Nanomedicine**, v. 26, n. 9, p. 1617-26, 2014.
- Simkó, M.; Gázsó, A.; Fiedeler, U.; Nentwich, M. Nanoparticles, free radicals and oxidative stress. **NanoTrust-Dossier** No. 012en, 2011.
- Sokolov, K. Follen, M.; Aaron, J.; Pavlova, I.; Malpica, A.; Lotan, R.; Richards-Kortum, R. Real-time vital optical imaging of precancer using anti-epidermal growth factor receptor antibodies conjugated to gold nanoparticles. **Cancer Res.**, v. 63, n. 9, p. 1999-2004, 2003.
- Stirbulov, R.; Bernd, L.A.; Solé, D. IV Diretrizes brasileiras para o manejo da Asma. **Rev. Bras. Alerg. Immunopatol.**, v. 32, n. 5, p. 447, 2006.
- Sugiura H.; Ichinose M. Oxidative and nitrative stress in bronchial asthma. **Antioxid. Redox Signal.**, v. 10, n. 4, p. 785-797, 2008.
- Szeffler S.J. Advances in pediatric asthma in 2013: coordinating asthma care. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 133, n. 3, p. 654-61, 2014.
- Taniguchi, N. Proc. of International Conference on Precision Engineering (ICPE), Tokyo, Japan, p. 18-23. 1974.

Thakor, A.S. Jokerst, J.; Zavaleta, C.; Massoud, T. F.; Gambhir, S. S. Gold nanoparticles: a revival in precious metal administration to patients. **Nano Lett.**, v. 11, n. 10, p. 4029-36, 2011.

Tillie-Leblond, I; Pugin J, Marquette CH, Lamblin C, Saulnier F, Briche A, Wallaert B, Tonnel AB, Gosset P. Balance between pro-inflammatory cytokines and their inhibitors in bronchial lavage from patients with status asthmaticus. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** v. 159, n. 2, p. 487–494, 1999.

Toumey, C. The man who understood the Feynman machine. *Nat Nanotechnol.* v. 2, n. 1, p. 9-10, 2007

Tsai Y.S.; Chen, Y. H.; Cheng, P. C.; Tsai, H. T.; Shiau, A. L.; Tzai, T. S, Wu, C. L. TGF- β 1 Conjugated to Gold Nanoparticles Results in Protein Conformational Changes and Attenuates the Biological Function. **Small.** v.9, n. 12, p. 2119-28, 2013.

Tsai, Y.S; Shiau, A.; Cheng, P.; Shieh, D.; Chen D.; Chou, C.; Yeh, C.; Wu C. A Biological Strategy for Fabrication of Au/EGFP Nanoparticle Conjugates Retaining Bioactivity, **Nano Letters**, v. 4, n. 12, p. 1209-1212, 2004.

Turrer C. L.; Ferreira F. P. M. Biomateriais em cirurgia craniomaxilofacial: princípios básicos e aplicações: revisão de literatura. **Rev. Bras. Cir. Plást.** v. 23, p. 234-239, 2008.

Victor, E. G.; Silveira, P. C.; Possato, J. C.; Rosa, G. L.; Munari, U. B.; Souza, C. T.; Pinho, R. A.; Silva, L. Streck, E. L.; Paula, M. M. 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**, v. 10, n. 11, p. 1-9, 2012.

Vigderman, L.; Khanal, B .P.; Zubarev, E. R. Functional Gold Nanorods: Functional Gold Nanorods: Synthesis, Self-Assembly, and Sensing Applications. **Adv. Mater.**, v. 24, n. 36, p. 4811-4841, 2012.

Wilczewska, A. Z.; Niemirowicz, K.; Markiewicz, K. H.; Car, H. Nanoparticles as drug delivery systems. **Pharmacol. Rep.**, v. 64, n. 5, p. 1020-37. 2012.

Wynn, T.A. Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 4, p. 583-594, 2004.

Wu, J.; Huang, W.; He, Z. Dendrimers as carriers for siRNA delivery and gene silencing: a review. **ScientificWorldJournal**, v. 29, p. 16, 2013.

Yamaguchi, Y. Suda, T.; Suda, J.; Eguchi, M.; Miura, Y.; Harada, N.; Tominaga, A.; Takatsu, K. Purified interleukin 5 supports the terminal differentiation and proliferation of murine eosinophilic precursors. **J. Exp. Med.**, v. 167, n. 1, p. 43-56, 1988.

Yavuz, B.; Pehlivan, S.B.; Unlu, N. Dendrimeric systems and their applications in ocular drug delivery. **ScientificWorldJournal**, p.1-13, 2013.

Yuan, X.; Sun, S.; Wang, S.; Sun, Y. Effects of Astragaloside IV on IFN-Gamma Level and Prolonged Airway Dysfunction in a Murine Model of Chronic Asthma. **Planta Med.**, v. 77, n. 4, p. 328-333, 2011.

Zabin, A.J.G. Química de (nano) materiais, **Quim. Nova**, v. 30, n. 6, p. 1469-79, 2007.

Zhang, X. D, Wu, D.; Shen, X.; Liu, P. X.; Yang, N, Zhao, B.; Zhang, H.; Sun, Y. M.; Zhang, L. A.; Fan, F. Y. Size-dependent in vivo toxicity of PEG-coated gold nanoparticles. **Int. J. Nanomedicine.**, v. 6, p. 2071-81, 2011.

Xiao, L.; Yeung, E. S. Optical Imaging of Individual Plasmonic Nanoparticles in Biological Samples. **Annu. Rev. Anal. Chem.** V. 7, p. 89-111, 2014.

Zyvex, Disponível em:<<http://www.zyvex.com>> Acesso em: 10 jan. 2014.