

U. PORTO



**FACULDADE DE FARMÁCIA
UNIVERSIDADE DO PORTO**

David António Silva Fernandes

Citotoxicidade e Captação de Nanopartículas de Ouro em Modelo Celular de Epitélio Intestinal Humano: Importância da Funcionalização

Dissertação de Mestrado

Mestrado em Toxicologia Analítica, Clínica e Forense

Trabalho realizado sob a orientação da Doutora Sónia Fraga

e co-orientação da Professora Doutora Helena Carmo

Departamento de Toxicologia

Faculdade da Farmácia da Universidade do Porto

Setembro de 2010

DECLARAÇÃO DE REPRODUÇÃO

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO CANDIDATO, QUE A TAL SE COMPROMETE;

O Autor,

(David António Silva Fernandes)

AGRADECIMENTOS

Esta página torna-se demasiado curta para poder agradecer, de modo apropriado, a todos aqueles que me ajudaram ao longo deste trabalho.

Os meus sinceros agradecimentos:

À Doutora Maria de Lourdes Bastos, por me ter aceite no curso de Mestrado em Toxicologia Analítica, Clínica e Forense e por nos inculcar a nós, alunos, uma paixão tão grande por esta ciência. Obrigado pelas palavras de encorajamento e sabedoria,

À Doutora Sónia Fraga, pela paciência, resistência e bondade em me ensinar e guiar através deste caminho com obstáculos tão imprevisíveis. Admiro-a pela sua dedicação, empenho e optimismo e sem a sua presença este trabalho teria sido, de todo, impossível. Muito, muito obrigado!

À Professora Helena Carmo, pelas palavras de conforto e de motivação que tornaram tudo mais suave e ajudaram a ultrapassar dias mais difíceis,

À Senhora Engenheira Maria Elisa Soares, pela sua preciosa ajuda, amizade e carinho e pela sua tenacidade na sua colaboração,

Aos meus colegas e restantes membros do Departamento de Toxicologia, pelo companheirismo, pelos ensinamentos e pela motivação transmitidos.

Ao Professor José Alberto Duarte pelas imagens de Microscopia Electrónica, e à Leonor pela síntese de nanopartículas, que sem o seu contributo fundamental este trabalho se tornaria muito mais difícil,

E à minha mãe, pelo apoio incondicional e por não me deixar desistir, sobretudo quando tudo parecia perdido e a vida deixou de ter significado. Nunca como nestes tempos tinha pensado no verdadeiro significado da palavra «mãe», e a noção de sacrifício pessoal fez-me amá-la mais do que eu seria capaz de conceber. Obrigado!

RESUMO

No presente trabalho pretendeu-se avaliar a potencial citotoxicidade induzida por nanopartículas de ouro (AuNPs) funcionalizadas com diferentes revestimentos em células Caco-2, um modelo de epitélio intestinal humano. As nanopartículas testadas apresentavam um diâmetro entre 23 e 35 nm e como agentes de revestimento foram usados o citrato, 11-MUA e os pentapéptidos CALNS e CALND. Os ensaios escolhidos para avaliação da viabilidade celular foram o de redução do MTT e incorporação de Vermelho Neutro. Para os intervalos de tempo (24 a 96 h) e de concentração (1 a 100 μ M) testados, não foram observados fenómenos de citotoxicidade.

No mesmo modelo celular, foi também avaliada a capacidade de translocação e internalização das diferentes AuNPs funcionalizadas. O estudo realizado foi bidireccional, sendo a quantificação de ouro presente nas fracções apical, basal e celular efectuada por Espectrometria de Absorção Atómica. Uma análise qualitativa do grau de internalização das nanopartículas nas células foi realizada por Microscopia Electrónica de Transmissão. As AuNPs revelaram uma baixa capacidade em atravessar a monocamada de células Caco-2, sendo a extensão da internalização dependente do revestimento

Palavras-chave: nanopartículas de ouro, Caco-2, revestimento, citotoxicidade, internalização, translocação

ABSTRACT

The present work aimed to evaluate the potential cytotoxic effects induced by gold nanoparticles (AuNPs) with different coatings in Caco-2 cells, a model of human intestinal epithelial cells. Sphere AuNPs nanoparticles (23 to 35 nm) were functionalized with citrate, 11-MUA and the pentapeptides CALNS and CALND. Cell viability was assessed by the MTT reduction and Neutral Red uptake assays for concentrations ranging from 1 to 100 μ M for 24 to 96 hours. Under the present experimental conditions, no cytotoxic effects were observed with any of the AuNPs tested.

Uptake and translocation of functionalized AuNPs across polarized and differentiated Caco-2 cells monolayers was also investigated. Bidirectional experiments were conducted and gold content of the apical, basal and cellular fractions was quantified by Atomic Absorption Spectrometry. A qualitative analysis of cellular internalization of AuNPs by Transmission Electron Microscopy was also performed. The AuNPs revealed a low ability to translocate across Caco-2 monolayers with the uptake efficiency being dependent of surface coating.

Key words: gold nanoparticles, Caco-2, coating, cytotoxicity, uptake, translocation

Índice

Introdução	2
1. Nanotecnologia e nanomateriais.....	3
1.1. Tipos de nanopartículas	5
1.2. Vantagens e limitações na utilização de nanopartículas em medicina	7
2. Nanopartículas de ouro.....	8
2.1. Perspectiva histórica	8
2.2. Propriedades físicas das AuNPs	9
2.3. Síntese.....	10
2.3.1. Redução por citrato	10
2.3.2. Método de Brust-Schiffrin	10
2.4. Funcionalização	11
2.4.1. Adição de biomoléculas: revestimento por péptidos	12
2.5. Métodos de caracterização	14
2.5.1. Microscopia Electrónica de Transmissão (T.E.M.).....	14
2.5.2. Espectrofotometria de UV/Vis	15
2.5.3. Medidas de dispersão de luz	15
2.5.3.1. Difraccção dinâmica de luz (DLS)	15
2.5.3.2. Potencial zeta	16
3. Aplicação de AuNPs em medicina	16
3.1. Terapia.....	16
3.1.1. AuNPs como sistema de libertação controlada.....	17
3.1.2. Terapia fototérmica	19
3.1.3. Terapia por radiofrequência.....	20
3.1.4. Terapia contra a angiogénese	20
3.1.5. AuNPs na terapêutica da artrite reumatóide	20
3.1.6. Terapia antibacteriana.....	20
3.2. Métodos de diagnóstico.....	21
4. Citotoxicidade de AuNPs	22
4.1. Estudos de citotoxicidade.....	24
4.2. Considerações sobre o tamanho, a forma e o revestimento na citotoxicidade de AuNPs.....	28

5. As células Caco-2 como modelo para o estudo do epitélio intestinal humano	30
5.1. Características gerais das células Caco-2.....	30
5.2. Estudos de transporte	31
5.3. Ensaio de citotoxicidade e captação de nanopartículas em células Caco-2	32
Objectivos.....	35
Materiais e Métodos	37
1. Síntese e caracterização das nanopartículas.....	39
1.1. Síntese e caracterização de nanopartículas de ouro (AuNPs) revestidas por citrato.....	39
1.2. Funcionalização	39
1.3. Preparação de veículo	40
1.4. Caracterização e análise das nanopartículas	41
2. Cultura celular – manutenção e propagação.....	41
3. Ensaio de citotoxicidade.....	42
3.1. Ensaio de MTT.....	42
3.1. Ensaio de NR.....	42
4. Estudos de captação e translocação de AuNPs.....	43
4.1. Verificação da integridade e permeabilidade celular.....	43
4.1.1. Medição da resistência eléctrica transepitelial (TEER)	43
4.1.2. Transporte de manitol.....	44
4.2. Estudo de captação.....	45
5. Tratamento estatístico dos dados.....	46
Resultados e Discussão	47
1. Síntese e caracterização de AuNPs	49
2. Avaliação do potencial citotóxico das AuNPs em células Caco-2.....	52
3. Estudos de captação e translocação	65
Conclusão.....	71
Bibliografia	75

Índice de figuras

Figura 1: Integração da escala nanométrica	3
Figura 2: Estrutura dos pentapeptídeos CALND e CALNS	13
Figura 3: Aplicações das AuNPs na terapêutica	17
Figura 4: Possíveis mecanismos mediados por espécies reactivas de oxigénio associados com a toxicidade de nanopartículas.....	24
Figura 5: Representação esquemática do epitélio intestinal	31
Figura 6: Representação esquemática de um sistema de cultura polarizada.....	32
Figura 7: Processo de medição de TEER	44
Figura 8: Solução coloidal de AuNPs e respectivo espectro de absorção.....	49
Figura 9: Imagens de T.E.M. de uma amostra de solução coloidal de AuNPs-Cit	50
Figura 10: Resultados dos ensaios de viabilidade (MTT e NR) para AuNPs-Cit, às 24 e 48 horas	52
Figura 11: Resultados dos ensaios de viabilidade (MTT e NR) para AuNPs-Cit, às 72 e 96 horas.....	53
Figura 12: Efeito de AuNPs-Cit (10 μ M e 100 μ M) e respectivo controlo, em células Caco-2 após 24 e 96 horas.....	54
Figura 13: Resultados dos ensaios de viabilidade (MTT e NR) para AuNPs-MUA, às 24 e 48 horas.....	55
Figura 14: Resultados dos ensaios de viabilidade (MTT e NR) para AuNPs-MUA, às 72 e 96 horas.....	56
Figura 15: Efeito de AuNPs-MUA, (10 μ M e 100 μ M) e respectivo controlo, em células Caco-2 após 24 e 96 horas	57
Figura 16: Resultados dos ensaios de viabilidade (MTT e NR) para AuNPs-CALNS, às 24 e 48 horas	58
Figura 17: Resultados dos ensaios de viabilidade (MTT e NR) para AuNPs-CALNS, às 72 e 96 horas	59

Figura 18: Efeito de AuNPs-CALNs (10 μ M e 100 μ M) e respectivo controlo, em células Caco-2 após 24 e 96 horas	60
Figura 19: Resultados dos ensaios de viabilidade (MTT e NR) para AuNPs-CALND, às 24 e 48 horas	61
Figura 20: Resultados dos ensaios de viabilidade (MTT e NR) para AuNPs-CALND, às 72 e 96 horas	62
Figura 21: Efeito de AuNPs-CALND (10 μ M e 100 μ M) e respectivo controlo, em células Caco-2 após 24 e 96 horas	63
Figura 22: Variação da média de valores de TEER em células Caco-2 ao longo de 21 dias de cultura	65
Figura 23: Percentagem de translocação e retenção celular de uma solução de 30 μ M AuNPs, após 2 horas de incubação	66
Figura 24: Imagens de T.E.M.: células Caco-2 na ausência de AuNPs e após tratamento com 100 μ M de AuNPs-Cit durante 24 horas	68
Figura 25: Imagens de T.E.M.: células Caco-2 após tratamento com 100 μ M de AuNPs-MUA e AuNPs-CALND durante 24 horas	68
Figura 26: Imagens de T.E.M.: células Caco-2 após tratamento com 100 μ M de AuNPs-MUA e AuNPs-CALND durante 24 horas	68

Índice de tabelas

Tabela 1: Representação da estrutura química de 11-MUA, CALND e CALNS	40
Tabela 2: Diâmetros das AuNPs, com diferentes revestimentos, determinados por DLS	50
Tabela 3: Valores do potencial zeta das AuNPs com diferentes revestimentos	51
Tabela 4: Coeficientes de permeabilidade do manitol em células Caco-2 com 21 dias de cultura	65

Abreviaturas e símbolos

A/Ala: alanina

A/Asn: asparagina

Au: ouro

AuCl_4^- : cloroaurato

AuNP: nanopartícula de ouro

AuNP-CALND: nanopartícula revestida com o péptido CALND

AuNP-CALNS: nanopartícula revestida com o péptido CALNS

AuNP-Cit: nanopartícula de ouro revestida com citrato

AuNP-MUA: nanopartícula de ouro revestida com 11-MUA

C/Cis: cisteína

Cit: citrato

CTAB: brometo de cetiltrimetilamónio

D/Asp: ácido aspártico

DNA: ácido desoxirribonucleico

D.L.S.: Difracção dinâmica de luz

FDA: Food And Drug Administration

HBSS: solução salina de Hanks

HEPES: N-(2-hidroxietil)-piperazina-N'-2-etanosulfónico

HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana

HAuCl_4 : ácido cloroaúrico

K: Kelvin

LDH: enzima lactodesidrogenase

MTT: brometo de (3- (4,5 dimetiltiazol – 2 – il) – 2,5 – difeniltetrazólio

11-MUA: ácido 11-mercaptoundecanóico

nm: nanómetro

NR: vermelho neutro

NP(s): nanopartícula(s)

PEG: polietilenoglicol

RNS: espécies reactivas de azoto

ROS: espécies reactivas de oxigénio

RER: retículo endoplasmático rugoso

RNA: ácido ribonucleico

S/Ser: serina

SH: grupo tiol

TNF: Factor Necrosante Tumoral

T.E.M: microscopia electrónica de transmissão

UV: ultravioleta

Uv/Vis: Ultravioleta/Visível

ζ: zeta

CAPÍTULO I

Introdução

INTRODUÇÃO

1. Nanotecnologia e nanomateriais

A nanotecnologia consiste na compreensão e controlo dos nanomateriais, matéria com dimensões entre aproximadamente 1 e 100 nanómetros (1×10^{-9} metros). A capacidade de visualizar, medir, fabricar e manipular matéria a nível da escala nanométrica permite o desenvolvimento de novas tecnologias com um impacto que irá afectar virtualmente cada sector económico (1). A nanotecnologia distingue-se de outras tecnologias devido às características físicas, químicas e biológicas únicas que ocorrem nos materiais à escala nanométrica e que possibilita novas aplicações (1,2). Essas propriedades podem ser então observadas e manipuladas à escala microscópica ou macroscópica para o desenvolvimento de materiais e dispositivos com funções e desempenhos inovadores. A nanoescala refere-se a um intervalo entre 1 e 100 nm, ainda que este intervalo de valores não seja absoluto (Figura 1).

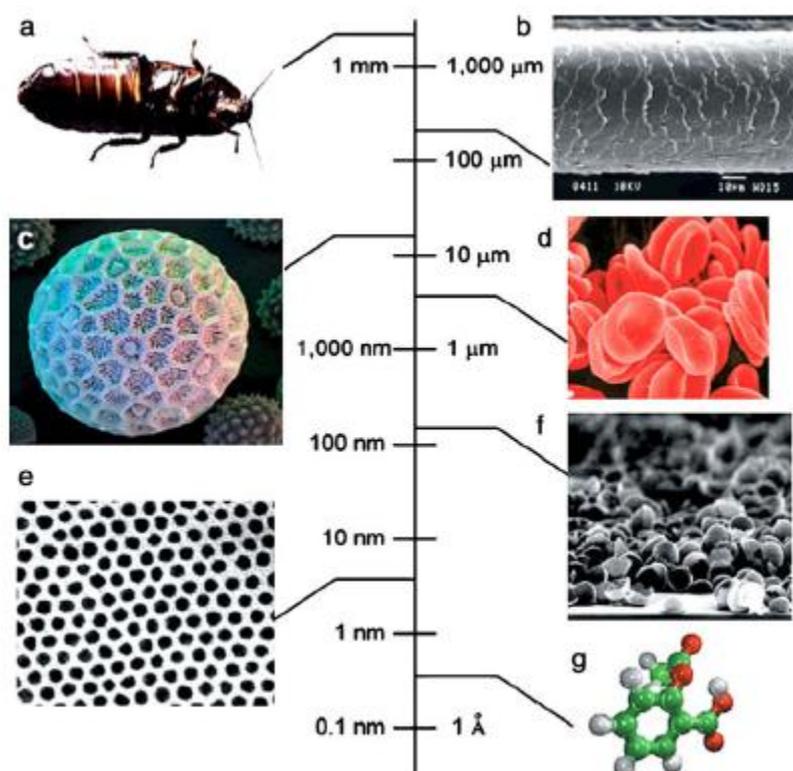


Figura 1. Integração da escala nanométrica. Comparação entre pequenos objectos como (a) um insecto, (b) cabelo humano, (c) grão de pólen, (d) glóbulos vermelhos, (e) agregados de paládio, (f) nanocristais de cobalto, (g) molécula de aspirina. Retirado de (3).

A importância das nanotecnologias reflecte-se na obtenção de inovações que possam contribuir para a resolução de muitos problemas que a sociedade enfrenta actualmente, nomeadamente na área de (i) biomedicina, (ii) tecnologias da informação (iii) produção e armazenamento de energia (utilização de dióxido de cerúlio (CeO_2) como catalisador de combustíveis), (iv) ciências dos materiais (utilização de nanopartículas de prata em roupa e desinfectantes, utilização de dióxido de titânio (TiO_2) em protectores solares), (v) alimentos, água e ambiente, entre outras. A comercialização de vários produtos derivados de nanotecnologias é já uma realidade, incluindo produtos médicos, componentes electrónicos, tintas e tecidos sendo um comércio em expansão cujo investimento é gradualmente crescente (1).

A transição de micropartículas para nanopartículas (NPs) pode levar a um elevado número de mudanças em propriedades físicas (4). As mudanças imediatamente perceptíveis são o aumento da razão área/volume e a predominância de efeitos quânticos. O aumento da área de superfície em relação ao volume é um processo gradual que ocorre com a diminuição do tamanho da partícula, com o comportamento dos átomos presentes na superfície das partículas a tornar-se dominante relativamente aos dos átomos presentes no interior. Este comportamento reflecte-se na interacção com outros materiais, permitindo o seu aproveitamento em processos catalíticos, na utilização de estruturas como eléctrodos, no aumento da resistência física, química e térmica de materiais. As propriedades quânticas reflectem-se no comportamento dos electrões livres que passam a comportar-se de um modo semelhante aos electrões ligados a átomos na medida em que apenas podem ocupar determinados estados de energia.

Nanofármacos estão já disponíveis para uso clínico (como o fármaco imunossupressor Rapamune[®], o antiemético Emend[®] ou o antilipidémico Tricor[®], já disponíveis nos Estados Unidos), e numerosos outros encontram-se em ensaios clínicos (5,6). Embora a nanotecnologia explore partículas entre 1 e 100 nm de diâmetro, o tamanho de partículas usadas em medicina pode variar entre 2 a 1000 nm (7). As nanopartículas encontram-se no mesmo intervalo de dimensões que os anticorpos, receptores membranares, ácidos nucleicos e proteínas, entre outras biomoléculas.

1.1 Tipos de nanopartículas

As nanopartículas podem ser agrupadas pela sua natureza orgânica ou inorgânica.

As nanopartículas de natureza orgânica incluem lipossomas, dendrímeros, nanomateriais de carbono e micelas poliméricas.

Lipossomas – os lipossomas são vesículas fosfolípídicas, com um tamanho entre 50 e 100 nm, com uma bicamada lipídica que se assemelha à das membranas biológicas e com uma fase interna aquosa (6). Os lipossomas podem classificar-se de acordo com o seu tamanho e número de camadas (multi, oligo ou multi-lamelares). A natureza anfifílica dos lipossomas torna possível o transporte de fármacos hidrofílicos (no seu interior, na fase aquosa) e fármacos hidrofóbicos (dissolvidos na membrana), sendo que a natureza da ligação de fármacos à membrana pode ser modificada com a adição de ligandos. Os lipossomas apresentam excelente capacidade de circulação, penetração e difusão. A sua aplicação como veículos data desde os anos 60 (8).

Micelas poliméricas – as micelas poliméricas consistem num conjunto de polímeros anfifílicos em torno de um núcleo hidrofóbico, que formam estruturas supra-moleculares em meio aquoso (6). O seu tamanho é usualmente inferior a 100 nm. Os polímeros anfifílicos podem ser constituídos por fosfolípidos, cadeias hidrofílicas de óxido de polietileno intercaladas com cadeias hidrofóbicas de óxido de polipropileno, cadeias de aminoácidos ou poliéster. Fármacos podem localizar-se no interior do núcleo ou ligados covalentemente a superfície das micelas.

Dendrímeros – os dendrímeros são polímeros altamente ramificados, de tamanho inferior a 15 nm, constituídos por um núcleo central, uma região interna e numerosos grupos terminais como poliamidas ou poliaminas (6). A natureza dos grupos terminais pode ser alterada de modo a facilitar a ligação de determinado fármaco, podendo ser funcionalizados com hidratos de carbono, péptidos ou silicone.

Nanomateriais de carbono – os nanomateriais de carbono incluem a família dos fulerenos (C_{60}) e outras nanopartículas constituídas por lâminas co-axiais de grafite, enroladas em cilindros e de tamanho inferior a 100 nm (6). Estas estruturas podem designar-se por nanotubos de parede simples ou nanotubos de paredes múltiplas, conforme possuam apenas uma lâmina ou várias lâminas enroladas concêntricamente. Apresentam uma elevada resistência, condutibilidade eléctrica e térmica.

As nanopartículas de natureza inorgânica incluem *pontos quânticos* (*Quantum dots*), nanopartículas magnéticas e nanopartículas metálicas. Normalmente apresentam um núcleo central inorgânico que determina as suas propriedades ópticas, electrónicas, magnéticas e fluorescentes.

Pontos quânticos – são nanocristais coloidais com fluorescentes e fotoestáveis, com um tamanho entre 2 e 10 nm (6). O seu núcleo central consiste na combinação de elementos dos grupos II-VI da tabela periódica (CdSe, CdTe, CdS, PbSe, ZnS e ZnSe) ou dos grupos III – IV (GaAs, GaN, InP e InAs), que são revestidos com uma camada de ZnS. Além de fotoestáveis, apresentam uma elevada resistência à degradação química.

Nanopartículas magnéticas – as nanopartículas magnéticas são nanocristais esféricos, com um tamanho entre 10 e 20 nm, com um núcleo de Fe^{2+} e Fe^{3+} revestido por dextrano ou polietileno glicol (PEG) (6).

Nanopartículas metálicas – as nanopartículas metálicas podem ter tamanhos entre 1 e 100 nm, sendo constituídas por metais como o ouro (Au), a prata (Ag), o níquel (Ni), a platina (Pt) e o dióxido de titânio (TiO_2) (6).

O financiamento da nanotecnologia é crescente (9). O interesse da aplicação da nanotecnologia na área da medicina levou à criação de um novo campo da ciência apelidado de nanomedicina. A nanomedicina consiste no processo de diagnóstico, tratamento, e prevenção de doenças ou lesões traumáticas, aliviando a dor e preservando ou incrementando a saúde humana recorrendo a ferramentas moleculares e ao conhecimento molecular do corpo humano (9). A nanomedicina tem como principais objectivos (i) a construção de estruturas à escala nanométrica para diagnóstico, monitorização e libertação de fármacos, (ii) a intervenção na genómica e proteómica (iii) a criação de máquinas moleculares capazes de identificar e eliminar agentes patogénicos, reparar ou substituir células ou componentes celulares *in vivo* (3,9).

1.2 Vantagens e limitações na utilização de nanopartículas em medicina

A capacidade das nanopartículas em interagir com outras moléculas, assim como a possibilidade de moldar as suas propriedades, torna-as instrumentos de elevado interesse na monitorização, diagnóstico e terapêutica de doenças. A sua aplicação como veículos de fármacos é promissora, uma vez que as nanopartículas podem modificar vários aspectos relacionados com o perfil farmacocinético. Podem aumentar a solubilidade de um fármaco, permitindo a sua administração por via parentérica (6,8), aumentar o seu tempo de semi-vida, aumentar a especificidade em relação ao alvo, reduzindo assim os efeitos secundários (uma vez que diminui a sua acumulação em tecidos saudáveis) (6,8). Podem também melhorar a biodisponibilidade, diminuir o seu metabolismo e permitir uma libertação controlada de fármacos. Um dos principais problemas que se coloca na descoberta de novos fármacos é precisamente a sua fraca biodisponibilidade e biodistribuição (8). A aplicação de nanopartículas como veículos permite reduzir a dose de fármacos a administrar, aumentando a eficácia terapêutica e os perfis de segurança de novos fármacos (8). A utilização de materiais biocompatíveis torna as nanopartículas alternativas seguras, evitando reacções de hipersensibilidade (8).

Contudo, existem algumas limitações ao uso de nanopartículas. Actualmente é difícil prever a biodistribuição de nanopartículas no organismo de acordo com as suas propriedades físico-químicas (8). A própria biodistribuição pode ser afectada por interacções indesejadas com moléculas, como proteínas, ou mesmo células pertencentes ao sistema de defesa do organismo, como monócitos ou macrófagos (8). A penetração no interior das células não é um processo fácil, requerendo estratégias de alteração da superfície das nanopartículas (10). O próprio destino das nanopartículas no interior das células é ainda pouco conhecido, podendo estas permanecer inalteradas, modificarem-se ou sofrerem metabolização

Apesar dos benefícios que as nanopartículas parecem trazer à medicina, algumas aplicações permanecem desafiantes, como por exemplo a monitorização *in vivo* de eventos celulares, a especificidade do local de acção ou a entrega de fármacos no interior da célula. Na tentativa de ultrapassar estas limitações, presentemente estão a desenvolver-se nanopartículas multifuncionais, isto é, nanopartículas com uma única estrutura definida mas com diferentes funcionalidades. Como exemplo, uma única nanopartícula seria capaz de se ligar especificamente a uma célula-alvo, emitir um sinal de localização que permitiria monitorizar o transporte de um fármaco ligado à nanopartícula e ainda, através de um estímulo externo, provocar a libertação controlada do fármaco. Contudo, a maior limitação na produção de nanopartículas multifuncionais é

a combinação dos diferentes grupos químicos requeridos à superfície da nanopartícula, sendo um processo considerado complexo. Além disso, a actividade dos diferentes grupos químicos tem que funcionar de um modo coordenado de modo a providenciar as diferentes funcionalidades. Um exemplo destas nanopartículas foi desenvolvido por Yang (10), e que consiste num nanossistema multifuncional combinando nanocristais magnéticos (para a monitorização), anticorpos terapêuticos (para a especificidade do alvo) e o fármaco doxorubicina (para o efeito terapêutico).

2. Nanopartículas de ouro

O ouro tem sido dos mais antigos objectos de investigação na ciência, e a sua aplicação em nanotecnologia tem feito renascer o seu interesse. As nanopartículas de ouro (AuNPs) são as nanopartículas metálicas mais estáveis, apresentam aspectos fascinantes como o comportamento individual das suas partículas, propriedades ópticas e magnéticas, e a sua aplicação na catálise e biologia (11 - 13). O ouro (elemento químico de símbolo *Au* com o número atómico 79) apresenta-se como um metal amarelo, brilhante e com um ponto de fusão de 1336 K (11). Por seu lado, as AuNPs apresentam uma coloração vermelha intensa e a temperatura de fusão é proporcionalmente decrescente com a diminuição do seu tamanho (12).

As AuNPs podem apresentar forma esférica (11), cilíndrica (11, 14), hexagonal (11) e triangular (15), ou ainda associarem-se a outras nanopartículas (como dendrímeros) ou metais (Ag, Pd, Pt, TiO₂, Fe, Zn e Cu, entre outros), formando as denominadas *nanoshells*. As *nanoshells* consistem num núcleo de átomos com elementos anteriormente referidos, revestido com átomos de ouro (16). As AuNPs podem ainda apresentar porosidades na sua estrutura, denominando-se *nanocages* (17).

2.1 Perspectiva histórica

O chamado «ouro coloidal» terá aparecido cerca do século V ou IV antes de Cristo, no Egipto e na China, muito depois da forma metálica (cerca de 5000 anos antes de Cristo). As suas primeiras aplicações foram com propósitos estéticos e curativos (11,12). O ouro coloidal foi inicialmente utilizado na fabricação e decoração de cerâmica, sendo o mais famoso exemplo a Taça de Lycurgus, tendo sido fabricada no século V ou IV antes de Cristo. Na Idade Média eram atribuídos ao ouro coloidal poderes curativos para várias doenças, nomeadamente doenças do coração, disenteria, epilepsia e tumores. No século

XVII, autores como Francisco Antonii e Johann Kunckels, publicam, respectivamente em 1618 e 1676, livros contendo métodos de síntese de ouro coloidal e suas aplicações em medicina. Ao longo do século XVIII, vários tratados sobre a síntese de ouro coloidal são publicados (11), nomeadamente quanto ao seu processo de síntese e suas aplicações. Em 1857, Faraday descreve a síntese de ouro coloidal a partir de uma solução de cloroaurato (AuCl_4^-) utilizando um sistema de duas fases contendo fósforo em dissulfeto de carbono. Faraday observou as propriedades ópticas de soluções coloidais desidratadas e observou mudanças de cor após compressão mecânica.

No século XX, vários métodos para a preparação de ouro coloidal foram efectuados e revistos. Desde os anos 90 que o ouro coloidal tem sido objecto de investigação intensiva, nomeadamente após novos métodos de síntese terem sido reportados por Schiffrin e Brust (18). Actualmente, a investigação centra-se nos seus efeitos quânticos.

2.2 Propriedades físicas das AuNPs

A cor vermelha das AuNPs em meio aquoso deve-se a um pico de absorção na região do visível (520 nm), denominado banda plasmónica (*Surface Plasmon Band* - SPB). A banda plasmónica deve-se sobretudo à oscilação colectiva da nuvem de electrões presente na superfície das nanopartículas, originada a partir da interacção com a radiação electromagnética incidente (11, 19). A sua largura diminui de tamanho com a diminuição do tamanho das nanopartículas, encontrando-se ausente para AuNPs com um diâmetro inferior a 2 nm e para a forma metálica do ouro (11). Para nanopartículas com diâmetros de 9, 15, 22, 48 e 99 nm, o comprimento de onda máximo para a banda plasmónica é, respectivamente, de 517, 520, 521, 533 e 575 nm, em meio aquoso (11). O pico e a largura da banda são também influenciados pela forma da partícula, pelo seu revestimento, pela constante dieléctrica do meio e pela temperatura (11). Assim sendo, por exemplo, um desvio no pico de absorção da banda plasmónica aquando da caracterização de nanopartículas após a sua síntese pode ser indicativo da presença de impurezas.

Estudos de fluorescência têm sido conduzidos com AuNPs, nomeadamente os que utilizam revestimentos fluorescentes como grupos pirenilo, polioctiltiofenilo e fluorenilo (11). A capacidade de fluorescência depende do tamanho e da forma das AuNPs, da distância entre o núcleo e o corante e a sobreposição entre a emissão de radiação electromagnética do corante e o espectro de absorção da nanopartícula.

2.3 Síntese

Nos últimos 40 anos, têm sido dedicados muitos esforços no sentido de fabricar AuNPs com dispersibilidade e tamanho controlados (20). Regra geral, AuNPs com determinado diâmetro são preparadas através da redução de sais de ouro na presença de agentes estabilizantes apropriados que previnem a agregação das partículas. A síntese de AuNPs pode ser conseguida por diversos métodos: métodos químicos (redução por citrato, método de Brust-Schiffrin, utilização de surfactantes) e por métodos físicos (fotoquímica por raios UV e Infra-vermelhos, radiólise e termólise). Nesta secção irá dar-se importância aos métodos químicos de síntese mais comumente utilizados na prática laboratorial.

2.3.1 Redução por citrato

Entre os diversos métodos convencionais de síntese de AuNPs por redução de derivados de ouro (III), o mais popular por tem sido o que utiliza a redução por citrato de HAuCl_4 em água, introduzido por Turkevich em 1951 (21). Este método leva à formação de nanopartículas de cerca de 20 nm em diâmetro. O método tem sido aperfeiçoado sucessivamente com o objectivo de obter nanopartículas com um diâmetro predefinido. Em 1973, Frens reportou um método capaz de controlar o tamanho das nanopartículas alterando a razão entre o agente redutor e o agente estabilizante (22). Este método caracteriza-se por ser fácil, rápido, reprodutível, do qual se obtêm NPs esféricas, com baixa dispersão, bastantes estáveis com diâmetros compreendidos entre os 10-20 nm, e que facilmente funcionalizáveis com diversos ligandos orgânicos.

2.3.2 Método de Brust-Schiffrin

O método de Brust-Schiffrin foi considerado inovador devido ao facto de permitir, pela primeira vez, a síntese de AuNPs estáveis a temperaturas elevadas, com dispersão diminuída e diâmetro entre 1,5 e 2 nm (18). Estas AuNPs podem ser repetidamente isoladas e redissolvidas na maioria dos solventes orgânicos sem agregação ou decomposição irreversíveis, podendo ser facilmente funcionalizadas. AuCl_4^- é transferido para uma molécula de tolueno utilizando brometo de tetraoctilamónio e reduzido por NaBH_4 na presença de dodecanotiol.

Este método permite a síntese de AuNPs estabilizadas com uma grande variedade de tióis: a ligação entre o grupo SH dos tióis e o Au da superfície das nanopartículas é uma ligação bastante estável. Contudo, e tal como no método de redução por citrato, diversas outras moléculas podem ser introduzidas na superfície das nanopartículas (tais como ligandos contendo fosfatos, aminas ou carboxilatos).

2.4. Funcionalização

A funcionalização de AuNPs consiste na adição de grupos funcionais (ligandos) à superfície das nanopartículas, sendo efectuada com objectivos específicos: aumentar a estabilidade coloidal das partículas, prevenir fenómenos de agregação ou determinar maior afinidade para determinado alvo (23).

Dependendo do sistema da partícula, isto é, o material do núcleo e o solvente em que as partículas estão dispersas, a escolha do ligando certo pode levar à formação de partículas estáveis (24). Os ligandos à superfície podem ser trocados por outros de forma a melhorar a estabilidade das nanopartículas, podendo dotá-las de novas propriedades ou funções (24). Na maioria dos casos, o novo ligando liga-se mais fortemente à superfície da nanopartícula. A geometria molecular dos ligandos em relação ao diâmetro das partículas é um factor que influencia o modo como as moléculas se distribuem em redor das partículas, afectando por sua vez a estabilidade coloidal das partículas. Um dos exemplos mais significativos é precisamente o caso das AuNPs em meio aquoso, sintetizadas por redução de citrato (24). As nanopartículas resultantes contêm iões citrato carregados negativamente adsorvidos à sua superfície e mantêm-se estabilizadas por repulsões electrostáticas. A camada de citrato pode ser substituída por ligandos que se liguem com maior afinidade, sendo os exemplos mais populares moléculas como fosfinas sulfonadas ou ácidos mercaptocarboxílicos, como o ácido 11-mercaptoundecanóico (11-MUA).

Em soluções orgânicas, as AuNPs são normalmente sintetizadas pelo método de Brust-Schiffrin. A síntese pode ocorrer na ausência de dodecanotiol. Desta forma, a síntese e o revestimento tornam-se acontecimentos independentes e a funcionalização pode ocorrer por outras moléculas além do dodecanotiol. Os grupos tióis são considerados aqueles que têm maior afinidade para o ouro. Apesar desta ligação ser classificada de covalente, o modo como se processa ainda a ligação destes grupos às nanopartículas é tema de debate (24).

A maioria dos ligandos que estabilizam as nanopartículas contra fenómenos de agregação pode consistir simplesmente em moléculas de cadeia relativamente inertes (cadeias hidrocarbonadas ou polietilenoglicol) ou possuírem grupos funcionais na final da sua cadeia. Na maioria dos casos em que as nanopartículas são solúveis em água, estes grupos funcionais são na sua maioria ácidos carboxílicos que actuam por repulsão entre si e que podem ser explorados para posterior funcionalização com outras moléculas. O mesmo se pode aplicar em nanopartículas sintetizadas em fase orgânica pelo método de Brust-Schiffrin, substituindo as moléculas de dodecanotiol por outras. Quando se procede à funcionalização de uma nanopartícula já revestida, essa funcionalização irá depender não do núcleo inorgânico mas sim do revestimento já existente. A adição de um revestimento resulta num aumento do diâmetro da nanopartícula e tem de ser preferencialmente efectuado de igual modo para todas as nanopartículas presentes no meio, isto é, as nanopartículas têm de apresentar o mesmo número de grupos funcionais na sua superfície. Isso é conseguido através do controlo estequiométrico da reacção, ou então através de técnicas de purificação.

Actualmente, um dos revestimentos mais utilizados na investigação é o polietilenoglicol (PEG). Devido à sua estrutura e estabilidade química, é considerado um polímero inerte e biocompatível. Estas características tornam-no desejável para aplicações na medicina, pois melhora a farmacocinética de fármacos, aumentando a sua hidrossolubilidade e diminuindo o risco de reacções imunogénicas (25). Neste trabalho, um dos revestimentos utilizados foi o ácido 11-mercaptoundecanóico (11-MUA). Este ligando tem a capacidade de estabilizar AuNPs, evitando fenómenos de agregação (26).

2.4.1. Adição de biomoléculas: revestimento por péptidos

A bioconjugação de nanopartículas consiste na extensão do conceito de funcionalização de nanopartículas com moléculas orgânicas de diferente composição, tamanho e complexidade (11). Exemplos incluem, por um lado, pequenas moléculas como lípidos, vitaminas, péptidos, açúcares e por outro moléculas maiores como proteínas, enzimas, DNA e RNA. A conjugação de nanopartículas inorgânicas com biomoléculas leva à formação de sistemas híbridos que permitem a interacção específica de nanopartículas com sistemas biológicos e permite aproveitar as propriedades específicas de ambos os materiais: por exemplo, a capacidade de fluorescência das nanopartículas e a capacidade de ligação específica das biomoléculas.

O revestimento de AuNPs com péptidos tem sido extensamente investigado, nomeadamente na sua capacidade em atravessar a membrana celular e atingir o núcleo (27). A sua preparação é um processo rápido e fácil, permitindo a produção de um elevado número de nanopartículas funcionalizadas (28). Os péptidos, ao serem pequenas moléculas em que a sequência de aminoácidos pode ser facilmente programada, permitem a sua utilização como ligandos que podem ser otimizados para estabilizar as nanopartículas ou permitir a introdução de diversos grupos funcionais. As principais vantagens da sua utilização é poderem evitar a agregação das AuNPs e possibilitarem o reconhecimento celular específico (29).

No presente trabalho usaram-se dois pentapéptidos, cuja sequência inicial de quatro aminoácidos CALN (Cis-Ala-Leu-Asn) é comum, diferindo apenas no aminoácido terminal: Asp (ácido aspártico, CALND) ou Ser (serina, CALNS). As figuras seguintes indicam a estrutura química dos pentapéptidos anteriormente descritos:

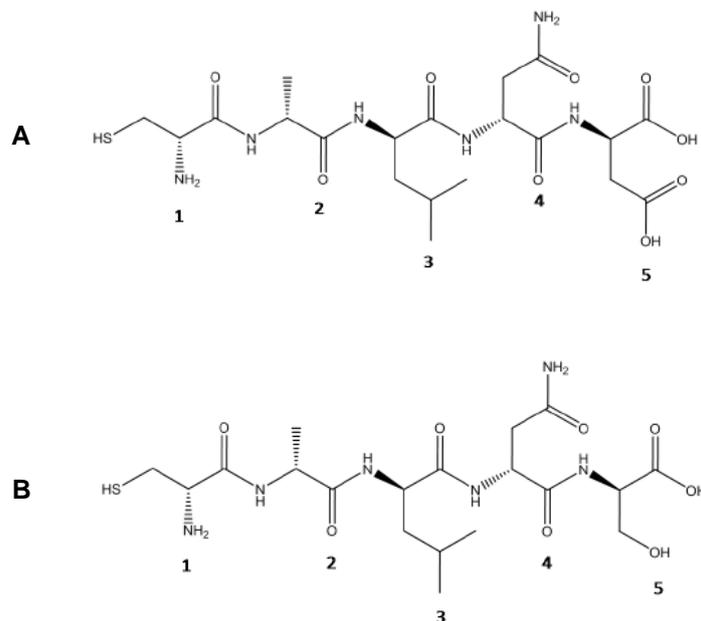


Figura 2. Estruturas dos pentapéptidos CALND (A) e CALNS (B).

O grupo tiol na cadeia lateral do N-terminal da cisteína (posição 1) é responsável pela ligação covalente à superfície metálica. A alanina (A) e a leucina (L) nas posições 2 e 3 possuem cadeias laterais hidrofóbicas que foram escolhidas para promover a auto-organização do péptido. A asparagina (N) na posição 4 é um aminoácido neutro mas hidrofílico, graças ao grupo amina na cadeia lateral. Por seu lado, a serina (S) e o ácido aspártico (D) apresentam carga negativa. Este facto é importante uma vez que a presença de cargas negativas no aminoácido terminal tende a reduzir possíveis fenómenos de agregação, aumentando a estabilidade das AuNPs.

2.5 Métodos de caracterização

A propriedade básica da nanopartícula, além do material que a constitui, é o seu tamanho, isto é, o seu diâmetro. O método mais comum de caracterização do tamanho das nanopartículas consiste na Microscopia Electrónica de Transmissão (T.E.M.) (30), que é capaz de providenciar imagens com o núcleo das AuNPs. Contudo, as dimensões dos núcleos das nanopartículas podem ser determinadas por técnicas como espectrofotometria de U.V./Vis, difracção dinâmica de luz (D.L.S), avaliação do potencial zeta, electroforese em gel, Microscopia de Varrimento por Tunelamento (S.T.M.), Microscopia de Força Atómica (A.F.M.), dispersão de raios-x de pequeno ângulo (S.A.X.S.) por difracção de raios-X, entre outros (31).

2.5.1. Microscopia Electrónica de Transmissão (T.E.M.)

A microscopia electrónica de transmissão (T.E.M.) é uma técnica bem estabelecida que permite analisar aspectos de materiais construídos à escala nanométrica, tais como a morfologia, o tamanho e o grau de agregação (20). Apesar de permitir obter informação estrutural sobre materiais de origem biológica, normalmente utiliza-se para obter informações sobre espécies metálicas. Devido à possível formação de artefactos durante a preparação de amostras, a informação obtida por T.E.M. é normalmente corroborada por outros métodos (como por exemplo por espectrofotometria e potencial zeta).

O princípio da T.E.M. baseia-se na emissão de um feixe de electrões altamente energético que incide numa amostra de fina espessura, interage com ela e é transmitido através da amostra com uma distribuição de intensidade e direcção controlada pelas leis de difracção impostas pelo arranjo cristalino dos átomos na amostra. O feixe transmitido é enviado através de várias lentes de ampliação para atingir a resolução pretendida e

transformada numa imagem de T.E.M. com contraste de fase, sendo posteriormente analisada. A partir de fotografias de T.E.M, é possível obter histogramas de distribuição do tamanho do núcleo das nanopartículas, obtendo-se assim informação crucial quanto à dispersão das nanopartículas. A microscopia electrónica de transmissão, para além de se utilizar na caracterização de nanopartículas obtidas, pode também ser usada para avaliar o grau de internalização e a sua localização biológica (21). Uma vez que o ouro é um material electronodenso, é de fácil visualização nas imagens.

2.5.2. Espectrofotometria de UV/Vis

A espectrofotometria de UV/Vis é utilizada na caracterização de nanopartículas, no sentido em que é recorrentemente empregue na validação da síntese e verificação da estabilidade coloidal das dispersões de NPs. A espectrofotometria de UV/Vis permite determinar a concentração de NPs em solução, que é suportada pela lei de Lambert-Beer, que relaciona matematicamente a absorvância (A) com a concentração (c) de NPs de acordo com a expressão:

$$A = \epsilon c l$$

Nesta equação, ϵ representa o coeficiente de extinção molar e l o percurso óptico da célula utilizada. Após a síntese das nanopartículas, a leitura da absorvância é efectuada para o intervalo de onda entre 300 e 800 nm.

2.5.3. Medidas de dispersão de luz

As medidas de dispersão de luz englobam a medição de difracção dinâmica de luz (D.L.S.) e do potencial zeta (potencial ζ).

2.5.3.1. Difracção dinâmica de luz (D.L.S.)

A difracção dinâmica de luz (D.L.S.) é uma técnica de dispersão de luz adequada para a determinação do diâmetro de partículas com dimensões na ordem dos nanómetros, podendo mesmo determinar tamanhos inferiores a 1 nm. As partículas possuem movimento aleatório, designado por movimento Browniano. Ao incidir o laser numa amostra da dispersão coloidal, a intensidade de luz dispersa depende do tamanho e concentração das partículas. Este tipo de medições (dispersão de luz estática) permitem

avaliar o tamanho médio, mais concretamente o raio hidrodinâmico médio das partículas numa solução coloidal. A D.L.S. é um método que mede a intensidade de flutuação do movimento Browniano das partículas e relaciona-o com o tamanho das mesmas. A medição da difracção dinâmica de luz permite ainda determinar distribuições de raios hidrodinâmicos, ou seja, avaliar a dispersão dos tamanhos das NPs.

2.5.3.2. Potencial zeta

O potencial zeta (ζ) é o potencial electrostático gerado pela acumulação de iões na superfície da partícula. É um método rotineiramente aplicado na determinação da carga de superfície das nanopartículas. O potencial ζ mede o potencial na interface “dupla camada eléctrica”, que está relacionada com a carga da superfície metálica da NP, mas também com a carga da esfera de hidratação (agente de revestimento e líquido adjacente). No entanto, o valor obtido em cada medição poderá variar consoante inúmeros factores, dos quais se destacam, a natureza e quantidade do agente de revestimento, temperatura, pH, força iónica. O potencial zeta é uma medida de estabilidade coloidal para NPs com agentes de revestimento iónicos, dado que quanto maior for o valor absoluto do potencial ζ , maiores as repulsões electrostáticas entre as partículas, e portanto maior a sua resistência à agregação.

3. Aplicação de AuNPs em medicina

A utilização das AuNPs converge sobretudo para três áreas da medicina: terapia, diagnóstico e imagiologia.

3.1. Terapia

A intervenção das AuNPs na terapêutica de patologias pode incidir no transporte de fármacos, na fototerapia e na terapia génica.

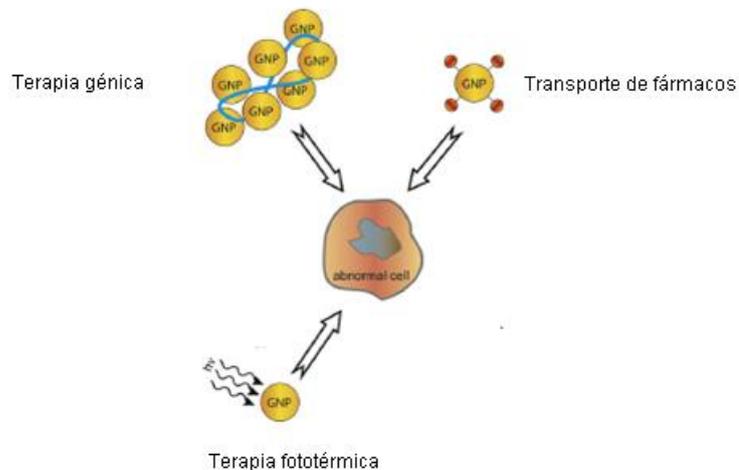


Figura 3: Aplicações das AuNPs em terapêutica. Adaptado de (20).

3.1.1 AuNPs como sistemas de libertação controlada

Um sistema de libertação controlada de fármacos, genes ou agentes de imagiologia é considerado ideal quando consegue efectuar a entrega de moléculas de uma forma eficaz, sendo estável na corrente sanguínea mas com a capacidade de libertar o seu conteúdo quando o órgão-alvo é atingido. As AuNPs têm sido consideradas como excelentes candidatas a veículos devido ao núcleo ser relativamente inerte e não-tóxico, à sua facilidade de síntese e versatilidade devido à capacidade de funcionalização (31).

As vantagens ao utilizar AuNPs no transporte de fármacos, relativamente à forma livre do mesmo, consistem em melhorar a solubilidade, a estabilidade *in vivo* e a sua biodistribuição. Além disso, as AuNPs seriam capazes de actuar como reservatórios de fármacos, de forma a garantir a sua libertação controlada (20). Aplicações específicas no transporte de fármacos podem classificar-se em transporte específico de fármacos, em que as AuNPs são conjugadas com um ligando que reconhece um receptor específico, e na terapia mediada por genes (31).

Mecanismos de libertação de moléculas adsorvidas à superfície das nanopartículas estão a ser investigados, nomeadamente mecanismos de libertação activados por estímulos internos, como a glutatona ou pela alteração de pH, ou estímulos externos, como a incidência de radiação electromagnética (32,33). Os princípios subjacentes a estes mecanismos de libertação seriam de que os estímulos internos adviriam de necessidades fisiológicas enquanto estímulos externos possibilitariam o controlo temporal da libertação.

A utilização de glutathione como mediador da libertação de pequenas moléculas, nomeadamente de modelos de fármacos hidrofóbicos, foi já reportada (20).

As AuNPs são capazes de transportar biomoléculas como péptidos, proteínas e ácidos nucleicos como o DNA e RNA.

A utilização de AuNPs seria inovadora para a terapia génica. A terapia génica é considerada uma estratégia ideal no que diz respeito ao tratamento de doenças genéticas hereditárias e adquiridas. As nanopartículas podem contornar problemas inerentes ao uso de outros agentes de transfecção que acarretam riscos de citotoxicidade e de resposta imunológica, ou outros sistemas não virais de eficácia reduzida (20). Os conjugados AuNPs-ácidos nucleicos podem apresentar ligações covalentes ou não-covalentes. O estudo de conjugados AuNPs-ácidos nucleicos, estabilizados por ligações não-covalentes, mostraram que AuNPs funcionalizados com grupos de amónia quaternária conseguem ligar-se ao DNA através de ligações electrostáticas, proteger o DNA de digestão enzimática e ser capaz de se libertarem facilmente na presença de glutathione (34). Por exemplo, foi avaliada com sucesso a transfecção do gene que codifica para a β -galactosidase em células de mamíferos 293T. A utilização de conjugados AuNPs-ácidos nucleicos estabilizados por ligações covalentes foi descrita no silenciamento genético (20).

As AuNPs podem também servir como transportadores de péptidos ou proteínas de interesse. Estudos mostraram que nanopartículas revestidas de amónio (carga positiva) conseguem ligar-se a proteínas aniónicas (como a β -galactosidase) e inibir a sua actividade (15). A actividade é recuperada por adição de glutathione, que se liga à superfície da AuNP, quebrando a ligação electrostática entre a nanopartícula e a proteína. A proteína transferrina também foi objecto de conjugação com AuNPs, tendo sido observada a sua internalização em células tumorais de cancro da mama Hs578T (35) Num estudo *in vivo*, AuNPs com um diâmetro de 26 nm foram conjugadas com TNF (factor necrosante tumoral), tendo sido injectadas em ratinhos portadores de tumores. A sua acumulação no tumor levou à diminuição da massa deste, de uma forma mais eficaz que o TNF isoladamente (36).

3.1.2 Terapia fototérmica

O efeito fototérmico das AuNPs tem sido investigado na terapia contra o cancro (31). Actualmente, os tratamentos convencionais implicam a remoção cirúrgica de tumores (com a limitação da aplicação a tumores de grande tamanho, acessíveis do ponto de vista cirúrgico), quimioterapia (com elevados efeitos secundários danosos), e radioterapia (cujas radiações aplicadas também atingem as células normais). A terapia fototérmica, que consiste na elevação local de temperatura através da aplicação de radiações promovendo a destruição de tumores, tenta evitar as limitações anteriores. A terapia fototérmica requer a utilização de compostos orgânicos ou inorgânicos que absorvam a radiação no local de aplicação, mas muitas vezes esses compostos requerem elevadas quantidades de radiação e não são desprovidos de citotoxicidade.

As vantagens na utilização de AuNPs na terapia fototérmica contra o cancro consistem na utilização de radiação com uma energia mínima e considerada desprovida de toxicidade (20). O efeito plasmónico de ressonância das AuNPs consegue converter a luz absorvida em calor. Além disso, o pequeno tamanho com que se conseguem sintetizar as AuNPs (entre 10 e 30 nm) permite um acesso mais fácil ao tumor. A possibilidade de agregação das nanopartículas permite uma forma mais eficaz de provocar a morte de células tumorais. Na pesquisa de novos agentes que possam ser utilizados na terapia fototérmica, têm sido empregues AuNPs de diferentes formas (cilíndricas, *nanocages*, *nanoshells*). Estas AuNPs têm a capacidade de absorver luz que vai do espectro de UV/Vis à região do infravermelho próximo (NIR), sendo contudo a região de NIR crucial na penetração da luz no interior de tecidos vivos. A penetração pode atingir alguns centímetros quando se aplicam comprimentos de onda entre 650 e 900 nm, o local ideal de absorção pela banda plasmónica das AuNPs.

3.1.3 Terapia por radiofrequência

A radiofrequência tem sido aplicada há quase um século com objectivos terapêuticos, sobretudo na luta contra o cancro hepático (31). Contudo, a sua utilização tem diversas limitações: é um procedimento invasivo, que se aplica a tumores com um tamanho definido, sendo comum a presença de lesões nos tecidos adjacentes e uma alta taxa de reincidência da patologia. Radioisótopos de ouro coloidal (^{138}Au) são actualmente utilizados na tentativa de ultrapassar estas limitações (37). Os radioisótopos de ouro emitem radiações β de baixo poder de penetração, sendo injectados directamente no tumor de forma a causar a morte das células cancerígenas sem afectar os tecidos

vizinhos saudáveis. A sua aplicação estende-se a vários tipos de cancro, como o do ovário, da próstata e nasofaríngeo (37,38).

3.1.4 Terapia contra a angiogénese

A angiogénese consiste na formação de novos vasos sanguíneos a partir de outros já existentes e tem um papel crucial no crescimento e difusão do cancro. A angiogénese pode ser um processo normal fisiológico ou patológico, em que há um elevado número de vasos sanguíneos permeáveis a proteínas plasmáticas. A angiogénese é um processo complexo regulado por factores pró- e anti-angiogénicos. As células tumorais têm a capacidade de desregular esse equilíbrio no sentido de promover a angiogénese. Os novos vasos sanguíneos permitem o acesso de oxigénio e nutrientes às células cancerígenas, permitindo o seu crescimento e difusão pelo organismo. Uma proteína denominada VEGF (factor de crescimento endotelial) é um factor pró-angiogénico responsável pela regulação da permeabilidade de vasos sanguíneos tumorais e é secretada pelas células tumorais, sendo necessária para a sua sobrevivência. A isoforma VEGF165 (constituída por 165 aminoácidos) é a predominante, apresentando um domínio de ligação à heparina. É precisamente nesse domínio que se ligam as AuNPs, inibindo a sua ligação ao receptor presente nas células endoteliais e diminuindo deste modo a angiogénese. Esta aplicação foi estudada em diversos tipos de cancro (cancro do ovário e do mieloma múltiplo) onde se observou um menor crescimento do tecido tumoral (37 - 39).

3.1.5. AuNPs na terapêutica da artrite reumatóide

O uso de AuNPs no tratamento paliativo da artrite reumatóide remonta à década de 20 do século passado (11). A angiogénese tem um papel fulcral na formação e manutenção da artrite reumatóide. Estudos realizados com nanopartículas de 13 nm de diâmetro, revestidas com citrato demonstraram uma inibição da proliferação e migração de TNF e uma redução considerável da inflamação, após injeção intra-dérmica durante 7 a 10 dias (40).

3.1.6 Terapia Antibacteriana

Sob o efeito de radiação incidente, as AuNPs têm capacidade de destruição térmica de patógenos, sendo AuNPs de 10, 20 e 40 nm revestidas com anticorpos anti-proteína A capazes de eliminar de um modo selectivo bactérias *Staphylococcus aureus* (41).

3.2. Métodos de diagnóstico

As AuNPs têm sido utilizadas *in vivo* como marcadores radioactivos desde os anos 50 do século XX e AuNPs conjugadas com anticorpos têm sido utilizadas desde os anos 80 para marcação biológica em microscopia electrónica (42). A aplicação inicial das nanopartículas neste campo foi na detecção de sequências específicas de interesse em DNA. A utilização de AuNPs em métodos de diagnóstico é vantajosa em relação aos métodos tradicionais, uma vez que a sua toxicidade é nula ou muito reduzida, funcionam como melhores agentes de contraste que determinados agentes orgânicos (que sofrem uma rápida fotodegradação) e a presença de propriedades espectroscópicas como a banda plasmónica permite ensaios colorimétricos (42). A utilização de AuNPs em métodos de diagnóstico pode seguir três vertentes: (i) ensaios colorimétricos, em que a mudança de cor ocorre após agregação das AuNPs funcionalizadas com DNA com amostras biológicas, (ii) nanosondas, após funcionalização das AuNPs com sequências específicas, como hidratos de carbono ou anticorpos e (iii) ampliação do sinal de métodos electroquímicos (31,42). Em imunoenaios, a utilização de AuNPs promove uma maior amplificação do sinal aumentando a sensibilidade da técnica. Por exemplo, a detecção da hormona gonadotrófica coriónica pode ser detectada até níveis de 1 pg mL^{-1} .

As AuNPs podem ser utilizadas na detecção, por imunoensaio, de diversas patologias como o cancro, Alzheimer (43), HIV (44) ou tuberculose (45).

O uso de AuNPs em técnicas de imagiologia é sobretudo devido ao efeito de ressonância plasmónica. AuNPs podem ser observadas por diferentes métodos como microscopia de contraste de fase, microscopia de fluorescência ou o por difracção de raios-X. Métodos mais tradicionais envolvem a ligação de conjugados anticorpos-AuNPs a antígenos presentes na superfície de células (31).

4. Citotoxicidade de AuNPs

Apesar das vantagens que aparentam apresentar as nanopartículas de ouro, numerosas questões têm sido elaboradas antes da sua implementação no campo da medicina. A compreensão dos seus potenciais riscos para a saúde humana é pouco clara, e informações como se processa a absorção, distribuição, metabolismo e excreção são ainda escassas (46). A essas questões poderá responder a nanotoxicologia (12).

A nanotoxicologia é um ramo emergente da nanotecnologia. A nanotoxicologia refere-se ao estudo das interações das nanopartículas com sistemas biológicos e a elucidação da relação entre as propriedades físico-químicas (como o tamanho, a forma, o revestimento, a composição e a agregação) de nanopartículas e a sua toxicidade (47). Existe a noção de que as nanopartículas podem penetrar em tecidos, células e organelos, precisamente devido ao seu tamanho reduzido. Essa penetração não é indiscriminada uma vez que depende das propriedades físico-químicas das nanopartículas bem como da identidade de moléculas funcionais presentes na sua superfície (12). Torna-se urgente compreender os mecanismos que ditam o comportamento e o destino (biodistribuição) das nanopartículas após introdução no organismo humano, não só para desenvolver sistemas adequados de nanopartículas para veículo de fármacos como para prevenir potenciais efeitos tóxicos. De um modo geral, nanopartículas podem ser absorvidas pelo organismo por inalação, ingestão ou penetração dérmica (48). AuNPs têm a capacidade de penetrar na pele, sendo maior a penetração quanto menor for o seu tamanho (49). Após absorção, as nanopartículas podem ser directamente excretadas ou então distribuírem-se por outros compartimentos, serem metabolizadas (ou armazenadas) e excretadas. Diversos estudos *in vivo* têm concluído que o tamanho das AuNPs condiciona a sua distribuição: nanopartículas maiores acumulam-se sobretudo no fígado, seguidamente do pulmão, baço e rim, enquanto que nanopartículas mais pequenas conseguem disseminar-se através da barreira hemato-encefálica (50,51).

Muitos estudos têm sugerido que as AuNPs são biocompatíveis e que podem ser utilizadas com segurança (52). Apesar de esta dedução resultar de uma associação directa entre o observado para o metal, na realidade as AuNPs poderão comportar-se de uma forma diferente. Ao possuírem propriedades distintas (como a elevada área de superfície em relação ao volume), as AuNPs podem despoletar mecanismos únicos de toxicidade. Vários mecanismos de toxicidade de nanopartículas metálicas têm sido associados à sua instabilidade química, nomeadamente através da libertação de metais

em solução, das suas propriedades catalíticas e da capacidade de oxidação-redução da superfície, que pode ter a capacidade de gerar espécies reactivas de oxigénio (ROS) e induzir *stresse* oxidativo (52). A modificação de nanopartículas metálicas dependerá de factores como a sua concentração no meio, do pH, da força iónica e das condições redox do meio.

Os nanomateriais podem interagir com a superfície ou com o interior das células. A formação de ROS na superfície da célula afecta a estabilidade da membrana e consequentemente a viabilidade celular (6,53,54). Intracelularmente os nanomateriais podem interagir com componentes celulares (provocando, por exemplo, a oxidação de lípidos, proteínas e DNA), alterando ou interrompendo funções celulares, ou ainda originar ROS (55). Interações de nanopartículas com mitocôndrias são consideradas as principais fontes de citotoxicidade, podendo induzir fenómenos apoptóticos, necróticos e mutagénicos.

A internalização de AuNPs pode ser efectuada por diversos mecanismos endocíticos: fagocitose, macropinocitose, endocitose mediada por clatrina ou endocitose não mediada por clatrina (56). O processo mais eficiente parece ser aquele que recorre à mediação por receptores. Um dos possíveis mecanismos de internalização por endocitose mediada por receptores é o reconhecimento celular de proteínas. Foi provado que a carga de superficial dos nanomateriais muda rapidamente no meio biológico, devido à adsorção de proteínas plasmáticas, aproximando-se a sua carga ao valor de carga do meio envolvente, nomeadamente aos das proteínas presentes em maiores quantidades no plasma: a albumina e o fibrinogénio. Ambas têm a capacidade de se ligar a partículas tanto com carga positiva como com carga negativa devido à presença de domínios na sua estrutura com diferentes densidades de carga. Contudo, a conformação favorável do fibrinogénio e o seu menor valor de carga em relação à albumina parecem torná-lo preferencial para a adsorção à superfície de nanopartículas (57).

Se a AuNP entrar na célula, a toxicidade pode manifestar-se com formação de ROS, dissolução de partículas ou mesmo lesões mecânicas dos organelos celulares (como os lisossomas, o retículo endoplasmático ou o núcleo). A formação de ROS resultar na lesão da mitocôndria por parte das nanopartículas. Quando o esta formação excede as defesas antioxidantes da célula, observam-se respostas inflamatórias e citotóxicas como peroxidação lipídica (dano na membrana celular), desnaturação proteica e dano no DNA (figura 4). A interacção da nanopartícula com a célula irá depender não só do seu revestimento mas também do seu tamanho. Partículas maiores podem potencialmente

causar mais danos a nível da membrana enquanto partículas de menor tamanho poderão atravessar a membrana mais facilmente e causar danos internos (55).

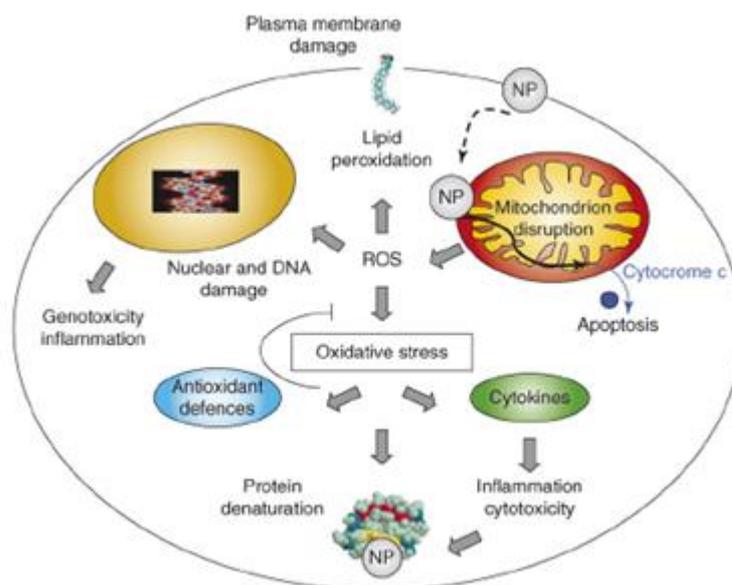


Figura 4: Possíveis mecanismos mediados por espécies reativas de oxigênio associadas com a toxicidade de nanopartículas. Quando a formação de espécies reativas de oxigênio ultrapassa as defesas antioxidantes, observam-se respostas inflamatórias e citotóxicas. Retirado de (6).

4.1 Estudos de citotoxicidade

O conhecimento acerca da citotoxicidade de AuNPs é crescente, embora estudos sobre o seu modo de internalização nas células e a relação com a forma e o tamanho, sejam ainda escassos. A comparação dos estudos disponíveis é dificultada devido às diferentes condições experimentais e linhas celulares utilizadas.

Um dos primeiros estudos efectuados sobre a citotoxicidade de nanopartículas de ouro esféricas pertence a Tkachenko e colaboradores (58). Nesse estudo, é realçada a necessidade de criar estratégias de internalização intra-nuclear de modo a, futuramente, possibilitar o diagnóstico fenotípico de doenças, a identificação de potenciais fármacos

que actuem a nível intra-nuclear e o desenvolvimento de novas terapêuticas baseadas na entrega de materiais no núcleo de células vivas. A estratégia de internalização nuclear abordada baseou-se na funcionalização de AuNPs (20 nm) com diferentes péptidos derivados de vírus SV40. Os resultados demonstraram que em células HepG2, as AuNPs eram internalizadas por endocitose mediada por receptor e que a sua localização subcelular (nuclear ou citoplasmática) era dependente da informação contida na sequência peptídica vírica utilizada na funcionalização. A viabilidade celular não era afectada após 12 horas de exposição a estas AuNPs.

Outro estudo do mesmo grupo demonstrou que a localização subcelular de AuNPs funcionalizadas com diferentes sequências peptídicas de SV40 e HIV-1 era também influenciada pela linha celular utilizada (HeLa, 3T3/NIH e HepG2). As diferenças observadas no perfil de distribuição intracelular das nanopartículas nas diferentes linhas celulares reflectiam-se na citotoxicidade (59).

Em 2003, Thomas e colaboradores investigaram a aplicação de conjugados de polietilenimina (PEI) com AuNPs (de 4 nm de diâmetro) como vectores de transfecção de DNA plasmídico na linha celular COS-7 (60). A citotoxicidade de AuNPs apenas revestidas com PEI foi inferior comparativamente à de AuNPs revestidas com PEI e ácido undecanóico. Imagens obtidas por T.E.M. mostraram a presença de AuNPs no exterior das células, associadas à membrana plasmática, no interior do citoplasma e no interior do núcleo.

Em 2004, Goodman avaliou a citotoxicidade de duas AuNPs de 2 nm diâmetro de carga oposta (61). O efeito destas nanopartículas na viabilidade foi estudado em células Cos-1, glóbulos vermelhos e culturas bacterianas (*Escherichia coli*). Os resultados obtidos indicaram, para todas as células utilizadas, as nanopartículas de origem catiónica exerciam efeitos moderadamente tóxicos em relação às nanopartículas aniónicas. Goodman e colaboradores consideraram que o mecanismo de toxicidade pareceu ser semelhante para as 3 linhas celulares, sendo as nanopartículas internalizadas passivamente e não por endocitose mediada por receptores. A toxicidade resultante das AuNPs catiónicas seria atribuída à sua adesão à membrana celular, causando uma variedade de interações que comprometeriam a sua viabilidade.

Em 2005, Shukla e colaboradores investigaram os efeitos citotóxicos e imunogénicos das AuNPs em células de linhas macrofágica RAW264.7 (62). As AuNPs utilizadas possuíam um diâmetro de aproximadamente 35 nm, sendo revestidas com lisina e poli-L-lisina. A viabilidade celular não sofreu alterações até ao tempo máximo da experiência (72 horas),

excepto em que a incubação das células com AuNPs na sua concentração máxima (100 μM) reduziu a viabilidade para 85%. Contudo este facto foi atribuído pelos investigadores ao *stresse* sofrido pelas células devido à depleção de nutrientes do meio, não sendo este substituído ao longo do ensaio. Foi então considerado que estas AuNPs não apresentavam citotoxicidade para os macrófagos da linha RAW264.7. A produção de espécies reactivas de azoto (RNS) e de oxigénio (ROS) manteve-se constante. Estes resultados sugerem que, para além da ausência de citotoxicidade, as AuNPs não parecem desencadear uma resposta imunológica inicial. A entrada de AuNPs nestas células pareceu dar-se por um processo endocítico dependente de energia, observando-se a internalização de nanopartículas a 37°C mas não a 4°C.

Em 2005, Connor e colaboradores avaliaram a internalização e citotoxicidade de AuNPs em células leucémicas humanas (linha celular K562) (63). As nanopartículas utilizadas possuíam um diâmetro de 4, 12 e 18 nm, com uma variedade de revestimentos: cisteína e citrato para as nanopartículas de 4 nm, glucose para as nanopartículas de 12 nm e citrato, biotina e CTAB para as nanopartículas de 18 nm. Nanopartículas revestidas com cisteína, citrato e glucose não aparentaram ser tóxicas para concentrações até 250 μM . AuNPs de 18 nm revestidas com CTAB revelaram toxicidade, ocorrendo morte celular quase total para a concentração de 0.1 μM . Estes valores foram muito semelhantes para CTAB livre (não ligado às nanopartículas), sendo investigado se a citotoxicidade observada se devia ao CTAB livre ou ao conjugado nanopartículas-CTAB. Procedendo-se à lavagem de CTAB da superfície das nanopartículas, observou-se que estas não causavam citotoxicidade nas mesmas condições que o ensaio tinha ocorrido previamente.

Em 2006, Pernodet e colaboradores estudaram o efeito de AuNPs (13 nm) revestidas com citrato em fibroblastos de origem dérmica (64). A intenção deste estudo foi observar as alterações morfológicas subtis provocadas pelas AuNPs. Segundo estes autores, a proliferação celular, a morfologia estrutural, o crescimento e síntese de proteínas (como a actina) podem ser afectados pela presença de nanopartículas, mesmo na ausência de citotoxicidade aparente. Com o aumento da concentração de AuNPs, o crescimento celular e a proliferação foram diminuindo. A adição de nanopartículas resultou na em modificações da estrutura de actina, nomeadamente na diminuição do seu diâmetro e da sua densidade. Estas AuNPs foram encontradas no interior dos lisossomas após uma hora de incubação, desprovidas do seu revestimento de citrato, sendo sugerido que a carga das nanopartículas é irrelevante após internalização celular.

Em 2006, Patra e colaboradores avaliaram o efeito de AuNPs revestidas de citrato (33 nm) nas linhas celulares A549 (carcinoma pulmonar hepático), BHK21 (rim de hamster) e HepG2 (carcinoma hepático humano) (65). A linha celular A549 mostrou-se mais susceptível que as outras, observando-se alterações na sua morfologia em curtos períodos de tempo (48 horas), indicando *stresse* sofrido pelas células. A redução da viabilidade foi proporcionalmente crescente com o aumento da concentração das AuNPs incubadas. A morte celular ocorreu por mecanismos apoptóticos (via das caspases). As células BHK21 e HepG2 não sofreram alterações na sua viabilidade. Os autores concluíram que a citotoxicidade não se manifesta de uma forma igual para todas as linhas celulares.

Em 2007, Pan e colaboradores avaliaram o impacto do tamanho das AuNPs na sua citotoxicidade nas linhas celulares HeLa (células epiteliais do carcinoma do cérvix), SK-Mel-28 (melanoma), L929 (fibroblastos de ratinho), e células J774A1 (células macrofágicas/monocíticas de ratinho). (66). As nanopartículas apresentavam uma diversidade de tamanhos (entre 0,8, e 15 nm de diâmetro), sendo revestidas com trifenilfosfina mono-fosfato (TPPMS). Além deste revestimento, AuNPs com 1.4 nm foram funcionalizadas com trifenilfosfina tri-fosfato (TPPTS). AuNPs com diferentes revestimentos mas do mesmo tamanho (1,4 nm) provaram ser as mais tóxicas, provocando uma rápida diminuição do crescimento celular em menores concentrações. Apesar das linhas celulares serem de origem bastante diferente, a inibição do crescimento causada pelas nanopartículas foi praticamente idêntica em todas elas, não se observando nenhuma variação significativa.

Em 2009, Uboldi e colaboradores investigaram a citotoxicidade induzida por AuNPs, de diferentes tamanhos (9,5; 11 e 25 nm) e revestimentos (presença ou ausência de resíduos de citrato de sódio à superfície) em células A549 e NCIH441 (células alveolares de tipo II) (67). Para a linha celular A549, AuNPs de 9,5 sem revestimento enquanto que as nanopartículas de 11 e 25 nm, revestidas com citrato, exerciam uma moderada redução da viabilidade. Na linha celular NCIH441 não se observou alterações à citotoxicidade. Tendo em conta estes resultados, os investigadores concluíram que a presença de citrato diminui a viabilidade na linha A549 e que, comparativamente, a linha NCIH441 é ligeiramente mais resistente aos efeitos citotóxicos das nanopartículas de ouro. Os efeitos mais pronunciados observaram-se na presença de revestimento, parecendo o efeito do tamanho na citotoxicidade ser secundário.

Em 2010, Butterworth e colaboradores efectuaram a avaliação da citotoxicidade de AuNPs de 1.9 nm de diâmetro em diversas linhas celulares (68): DU-145 e PC-3 (células prostáticas de cancro humano), MDA-231 e MCF-7 (células de cancro da mama humano), L-132 (células epiteliais alveolares humanas), T98G (células de glioblastoma humano), astrócitos obtidos a partir de cultura primária e AGO-1522B (células primárias de fibroblastos humanos). A resposta foi bastante variável: a percentagem de sobrevivência nas linhas PC3, AGO 1552 e T98G foi reduzida até praticamente metade, relativamente ao controlo. A adição de AuNPs em células MDA-231-MB não pareceu alterar a sua proliferação relativamente ao controlo, enquanto que a proliferação na linha DU-145 apresentou os níveis mais baixos do estudo. Embora nas restantes linhas celulares não se observasse uma alteração significativa nos níveis de ROS, na linha celular DU-145 houve um incremento na sua produção, sendo sugerido pelos autores de que a morte celular observada foi mediada pelo incremento destas espécies oxidantes.

4.2 Considerações sobre o tamanho, a forma e o revestimento de AuNPs na citotoxicidade

A importância do tamanho, da forma e do revestimento na citotoxicidade de AuNPs parece conflituosa e contraditória (67). Ainda não é possível clarificar sobre o predomínio do tamanho ou do revestimento na citotoxicidade induzida por AuNPs. Um estudo de Pan e colaboradores mostrou que o tamanho das nanopartículas de ouro esféricas tem um papel determinante na citotoxicidade de células HeLa, em detrimento do revestimento (66). Por seu lado, Uboldi e colaboradores atribuem a citotoxicidade de AuNPs revestidas com citrato em células A549 e NCIH441, ao revestimento mais que ao tamanho (67). Connor e colaboradores mostraram a ausência de citotoxicidade de AuNPs com diversos revestimentos em células K562 (63). Apesar destas discrepâncias, há que recordar que foram utilizados diferentes modelos celulares, diferentes concentrações de nanopartículas e diferentes condições de cultura. Não é possível portanto estabelecer uma generalização quanto a esta questão.

Procedendo à análise de cada propriedade separadamente, e dentro de cada linha celular, os resultados são muito interessantes. O tamanho de uma nanopartícula é um factor que sem dúvida influencia a citotoxicidade. Quanto menor o seu tamanho, mais facilmente ela se poderá distribuir pelo organismo e mais probabilidades terá de ser internalizada na célula, podendo potencialmente aí provocar efeitos nefastos. A observação por T.E.M. de células mostrou que, quanto mais as nanopartículas se

encontram perto da região perinuclear, maiores efeitos tóxicos são observados. Este facto prende-se com o pressuposto das nanopartículas, após atravessarem o núcleo, se ligarem ao DNA e causarem dano na maquinaria genética. Contudo, parece existir um valor limite em que essa internalização é maior. Isto significa que, se o diâmetro for demasiado reduzido, ou demasiado elevado a nanopartícula pode não entrar na célula. Para nanopartículas esféricas, modelos matemáticos previram que a internalização de nanopartículas é máximo para um valor em redor de 25 nm de diâmetro (69), no entanto Chitrani e colaboradores concluíram que o valor é de 50 nm para células HeLa (70). Ainda que o diâmetro óptimo de internalização não esteja estabelecido, o tamanho parece ditar a forma como a nanopartícula interage com a célula, nomeadamente através da ligação a um receptor. Seleccionar nanopartículas com um diâmetro óptimo de internalização é um dos interesses da investigação actual, visto permitir terapêuticas optimizadas (69).

O tipo de revestimento também é um factor importante na citotoxicidade de nanopartículas: por exemplo, o revestimento brometo de cetiltrimetilamónio (CTAB) é tóxico para as células (63). A tendência será para escolher uma molécula de revestimento que não apresente citotoxicidade. Ainda que se considerem nanopartículas com carga negativa mais citotóxicas que as nanopartículas com carga positiva (supostamente devido ao efeito de repulsão existente entre as mesmas cargas da partícula e da célula), tal visão pode considerar-se redutora uma vez que moléculas presentes no meio *in vivo* (como o fibrinogénio e a albumina) podem alterar a sua carga. A forma é outro dos parâmetros a ter em conta na citotoxicidade das nanopartículas. Infelizmente, existem poucos estudos que comparem nanopartículas de ouro de diferentes formas directamente entre si. Chitrani e colaboradores estudaram a diferença na internalização de AuNPs esféricas, com diâmetros de 14, 30, 50, 74 e 100 nm, e AuNPs cilíndricas (40 × 14 nm e 74 × 14 nm) em células HeLa (71). Os resultados mostraram que a internalização das nanopartículas depende da forma, sendo menor para nanopartículas de ouro cilíndricas que para as nanopartículas de ouro esféricas. Os motivos por detrás desta diferença parecem prender-se com a redução do número de receptores disponíveis para ligação para as nanopartículas cilíndricas e com a menor quantidade de proteínas adsorvidas que facilitem a endocitose. Alkilany comparou nanopartículas de ouro de forma esférica e cilíndrica, com o mesmo tipo de revestimento e concluiu que a citotoxicidade das nanopartículas de ouro cilíndricas é maior em células HT-29 (72). Se há menor internalização, deveria haver menor toxicidade. Mais estudos são certamente necessários para resolver esta ambiguidade.

5. As células Caco-2 como modelo para o estudo do epitélio intestinal humano

5.1 Características gerais das células Caco-2

A linha celular Caco-2, derivada de um adeno-carcinoma de cólon humano, um dos modelos celulares mais comumente utilizados e melhor caracterizado para efectuar os estudos de absorção de fármacos (73). O seu uso foi aprovado e recomendado por autoridades reguladoras como a FDA (74). O estudo da absorção de fármacos origina resultados de transporte semelhantes aos observados *in vivo* (75, 76). As células Caco-2 são úteis na identificação de candidatos a fármacos com potenciais problemas de absorção e na sua selecção com base nas suas características de absorção (77). Várias proteínas transportadoras bem como enzimas metabólicas são expressas nas células Caco-2 (71). Cultivadas em monocamadas num suporte de policarbonato, as células Caco-2 exibem uma diferenciação funcional e estrutural espontânea, apresentando polarização, que são características das células epiteliais do intestino delgado (72).

Após 21 dias de cultura, os sistemas de cultura celular Caco-2 atingem o máximo de diferenciação, sobretudo ao nível da expressão de transportadores. Ao longo desses 21 dias, as características morfológicas das células Caco-2 vão-se alterando até as células atingirem a maturidade. No 4º dia, observam-se junções apertadas entre células adjacentes, mesmo na ausência de confluência (76). As células apresentam grandes quantidades de RER, mitocôndrias e ausência de glicogénio. A sua forma é escamosa, com poucas e imaturas microvilosidades na região apical. No 7º dia, as células atingem a confluência, passando a sua forma de escamosa a cuboidal, com observação de junções intercelulares (desmossomas). No 14º dia, altera-se a sua forma de cuboidal a colunar, estando o núcleo localizado no bordo basolateral. No 21º dia as células permanecem polares, com um pequeno número de extensões citoplasmáticas estendendo-se para a câmara receptora, aumentando esse número até ao 28º dia de cultura.

Como medidas de avaliação da integridade e permeabilidade da monocamada celular podem ser determinadas a resistência eléctrica transepitelial (TEER) e o transporte paracelular de manitol (71, 76). A medição da TEER é efectuada utilizando um voltímetro com eléctrodos colocados na câmara superior e inferior do sistema. A TEER da monocamada aumenta com o tempo de cultura. Os valores de TEER dependem da área de superfície das membranas, da densidade celular, do tipo de filtro e do número de passagens, apresentando intervalos de valores entre 150 a 700 ohms·cm². Os valores de TEER do intestino delgado são bastante inferiores aos da monocamada de células Caco-2, estando os valores situados entre 40 a 50 ohms·cm².

5.2. Estudos de transporte

Nos epitélios, as moléculas podem ser transportadas de dois modos diferentes: através as junções apertadas entre as células (via paracelular) ou atravessando a membrana luminal, o citoplasma da célula e a membrana basolateral (figura 5):

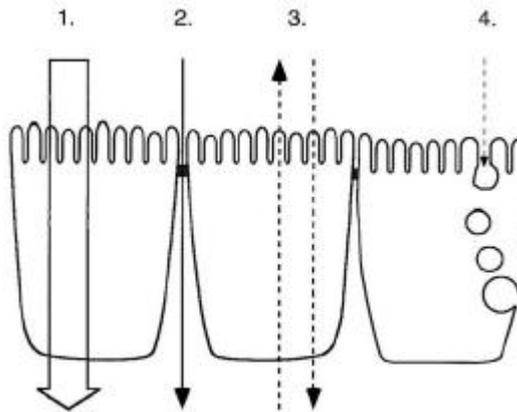


Figura 5: Representação esquemática do epitélio intestinal, evidenciando as diferentes vias de transporte: 1, a via transcelular; 2, a via paracelular; 3, a via transcelular mediada por transportadores; 4, a via transcelular mediada por transcitose. Retirado de (78)

Os estudos de transporte são normalmente efectuados após 21 dias de cultura, quando a expressão de transportadores atingem a sua expressão máxima (77). Os ensaios de transporte são efectuados em sistemas de cultura de células polarizadas, em que as células Caco-2 são cultivadas em monocamada, existindo uma câmara superior (apical) e uma câmara inferior (basal), onde se adiciona meio de cultura até à realização do ensaio (figura 5). Nesses sistemas, as células em monocamada encontram-se numa membrana porosa, sendo o diâmetro dos poros variável. Os estudos de transporte de substâncias podem ser efectuados no sentido apical-basal ou no sentido basal-apical.

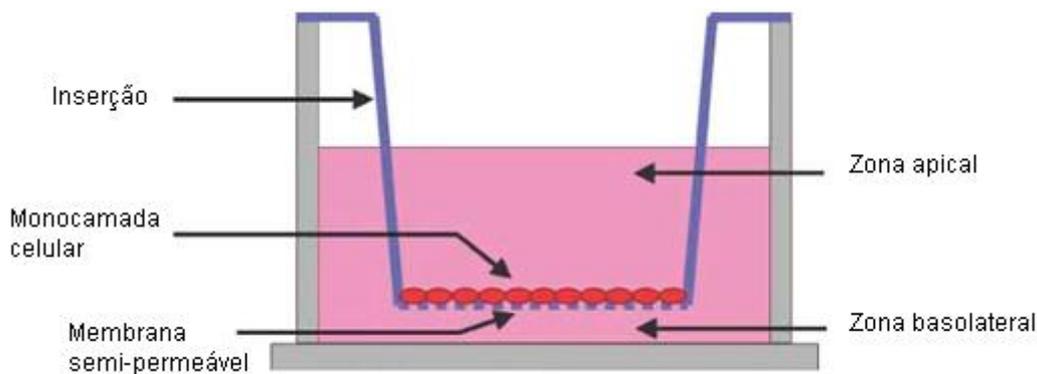


Figura 6: Representação esquemática de um sistema de cultura polarizada.

5.3. Ensaios de toxicidade e captação de nanopartículas em células Caco-2

Ainda que raros na literatura, começam a surgir os primeiros ensaios sobre o transporte de nanopartículas através de modelos de epitélio intestinal humano.

Em 2009, Koeneman e colaboradores avaliaram investigaram o mecanismo através do qual nanopartículas de dióxido de titânio (TiO_2) poderiam atravessar o epitélio intestinal, recorrendo a ensaios toxicológicos e de transporte (78). O TiO_2 , como nanomaterial, é utilizado para diversas aplicações, nomeadamente no uso de filtros solares, pasta de dentes e outros cosméticos. Neste estudo, células Caco-2 foram expostas a nanopartículas de TiO_2 de 500 nm. A percentagem de transferência das nanopartículas do compartimento apical para o compartimento basal foi determinada após 24 horas de exposição. Os resultados mostraram que cerca de 91.0% de titânio permaneceu na fracção apical, 6,8% foi detectado na superfície das células ou no interior das células e 2,2% atravessou a monocamada, encontrando-se na parte basal. A análise morfológica por microscopia electrónica mostrou que as microvilosidades sofreram alterações no seu arranjo: o seu número era reduzido e a sua forma não era cilíndrica. A principal conclusão que os investigadores retiraram destes ensaios foi a de que, apesar de não provocar morte celular, alterações celulares subtis ocorreram que podem condicionar o correcto funcionamento celular e levar ao desenvolvimento de doenças inflamatórias.

No mesmo ano, Koeneman publicou um trabalho semelhante em que avaliava o transporte de pontos quânticos em células Caco-2 (79), com um núcleo de cádmio associado a telúrio. Concentrações de 1 mg/L, 10 mg/L e 1000 mg/L foram aplicadas na parte basal do sistema de cultura, recuperando-se na fracção basal 34.1%, 20,4% e 21.7%, respectivamente da solução aplicada. Estas elevadas percentagens foram

atribuídas aos fenómenos de morte celular que danificaram a monocamada e permitiram a passagem de uma elevada quantidade de nanopartículas.

OBJECTIVOS

A presente dissertação pretende contribuir para o esclarecimento da importância do revestimento na sua captação, translocação e citotoxicidade de nanopartículas de ouro.

Deste modo, os estudos realizados em células Caco-2, um modelo celular de epitélio intestinal humano, tiveram como principais objectivos:

- Avaliar a potencial citotoxicidade de nanopartículas de ouro (AuNPs) com diferentes revestimentos (citrato, 11-MUA, CALND e CALNS) pelos ensaios de redução do MTT e captação do Vermelho Neutro (NR);
- Detectar possíveis alterações morfológicas das células induzidas pelas AuNPs
- Avaliar quantitativamente o grau de translocação e captação nas AuNPs funcionalizadas
- Avaliar qualitativamente por Microscopia de Transmissão Electrónica a internalização de AuNPs com diferentes revestimentos.

CAPÍTULO II

Materiais e Métodos

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Síntese e caracterização das nanopartículas

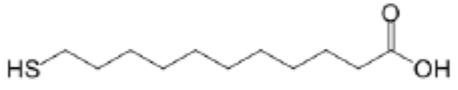
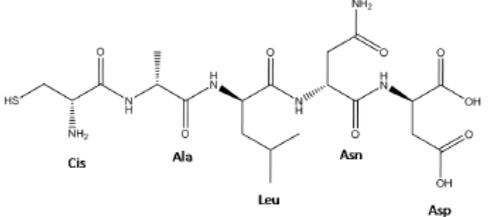
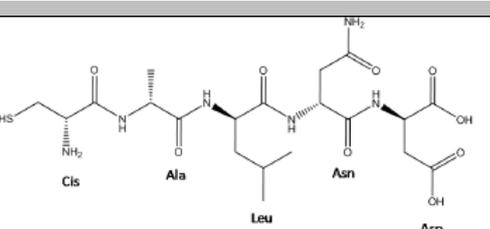
1.1 - Síntese de nanopartículas de ouro (AuNPs) revestidas por citrato

As nanopartículas de ouro esféricas com o diâmetro de 20 nm foram sintetizadas na Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, pelo método de redução de ouro por citrato (80). Este método insere-se no tipo de síntese em que a redução ocorre quimicamente, tendo esta sido inicialmente descrita por Turkevich e colaboradores (21). em 1951. Neste método o ouro proveniente do agente precursor, ácido tetracloroaúrico (III) em solução aquosa e à temperatura de ebulição, é reduzido a ouro metálico por acção do citrato de sódio, um agente redutor fraco que funciona simultaneamente como agente de revestimento. O citrato é introduzido no meio reaccional em excesso. À medida que ocorre a redução do ouro, o restante citrato de sódio, sob a forma de ião citrato carregado negativamente é adsorvido à superfície da AuNP. Uma vez revestida vai repelir as restantes NPs existentes em solução devido a repulsões electrostáticas, prevenindo assim a agregação e um crescimento descontrolado das mesmas. Todos os procedimentos foram efectuados em condições de esterilidade.

1.2. Funcionalização

Os agentes de revestimento utilizados foram compostos de origem orgânica, nomeadamente uma molécula bifuncional (ácido 11-mercaptoundecanóico, 11-MUA) e dois pentapéptidos (CALND e CALNS). A seguinte tabela apresenta as fórmulas de estruturas de cada um dos compostos orgânicos utilizados como agentes de revestimento.

Tabela 1: Representação da estrutura química dos diferentes revestimentos utilizados neste trabalho: 11-MUA, CALND e CALNS.

Molécula Orgânica	Fórmula de Estrutura
11-MUA	
CALND	
CALNS	

A adição dos agentes de revestimento foi efectuada determinando a concentração do total de NPs, determinando-se de seguida a quantidade equivalente de agente de revestimento (11-MUA ou péptido) necessária para funcionalizar a superfície de cada NP na razão molar agente de revestimento/NP de 120.

1.3 Preparação de veículo

O veículo foi preparado tendo em conta o meio em que as NPs se encontram presentes. Foram preparadas soluções contendo $3,529 \times 10^{-3}$ M de citrato de sódio e $3,79 \times 10^{-4}$ M de cloreto de sódio, sendo estas filtradas de modo a assegurar a sua esterilidade.

1.4 Caracterização e análise de nanopartículas

A caracterização e a análise de NPs ficaram a cargo do Departamento de Química da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, onde foram efectuadas por diversas técnicas, tais como espectrofotometria de UV/Vis, microscopia electrónica de transmissão (T.E.M.), medidas de dispersão que englobaram a difracção dinâmica de luz (D.L.S.) e medição do potencial zeta (ζ -potencial).

2. Cultura celular - manutenção e propagação

Neste trabalho, foi utilizada a linha Caco-2 (HTB-37, American Type Culture Collection, EUA), proveniente de um adenocarcinoma de cólon humano. As células foram mantidas a 37°C com 5% de CO₂, em meio Eagle modificado por Dulbecco com 4.5 g/L de glucose (DMEM), suplementado com 10% de soro bovino fetal (Gibco), 1% de solução de antibiótico-antimicótico (10000 U/mL penicilina/estreptomicina e 250 µg/mL anfotericina B) e 1% de solução de aminoácidos não-essenciais (Gibco). A propagação celular foi efectuada expondo as células durante breves minutos a uma solução de 0.25% tripsina-EDTA (Gibco). Para os ensaios de citotoxicidade, as células foram cultivadas em placas de 96 poços (TPP, Switzerland) com uma densidade celular de 65 000 células/cm². Nos ensaios de acumulação, as células foram mantidas a 37°C em idênticas condições. As células foram cultivadas, na densidade de 100 000 células/cm², num sistema vulgarmente designado por *Transwell*[®] e mantidas em cultura durante 21 dias, de modo a permitir a sua completa diferenciação (50). Este sistema consiste numa membrana semi-permeável de politereftalato de etileno (PET) com uma porosidade de 0.4 µm (BD Falcon[®], EUA) e permite a polarização celular. Todas as experiências foram efectuadas entre a passagem 58 e 68.

3. Ensaio de citotoxicidade

Os ensaios de avaliação da citotoxicidade (redução do MTT e captação do Vermelho Neutro) foram realizados após as células atingirem a confluência, 4 dias após a sementeira. A avaliação da citotoxicidade de AuNPs esféricas, com diferentes revestimentos, bem como dos seus veículos, foi efectuada em células Caco-2 expostas durante 24, 48, 72 e 96 horas, na concentração de 1, 3, 10, 30 e 100 μM , em soluções extemporâneas preparadas em meio de cultura sem soro bovino fetal.

A avaliação qualitativa da morfologia de células expostas a AuNPs de diferentes revestimentos foi realizada por observação em microscópio óptico de contraste de fase (modelo) e registo fotográfico (Canon Power Shot S40).

3.1 Ensaio de MTT

O ensaio de MTT (brometo de (3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenilterazólio) permite avaliar a viabilidade celular, analisando a actividade metabólica das células a nível mitocondrial. O MTT, um composto de cor amarelada, é reduzido em sais de formazano, um composto de cor arroxeadada, pelas redutases mitocondriais das células metabolicamente activas.

O ensaio de MTT (brometo de (3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenilterazólio) permite avaliar a viabilidade celular, analisando a actividade metabólica das células a nível mitocondrial. O MTT, um composto de cor amarelada, é reduzido em sais de formazano, um composto de cor arroxeadada, pelas redutases mitocondriais das células metabolicamente activas. O MTT 0,5 mg/mL foi preparado em solução de Hanks (HBSS), tendo este como constituintes 5,56 mM glucose, 1,26 mM CaCl_2 , 0,49 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,41 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5,33 mM KCl, 0,44 mM KH_2PO_4 , 137,93 mM NaCl e 0,34 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Após aspiração do meio, o volume de MTT adicionado às células foi de 150 μl , sendo o período de incubação de 30 minutos, a 37°C. Seguidamente, a solução foi aspirada e foram adicionados 200 μl de DMSO, para dissolução dos cristais de formazano formados durante o período de incubação com MTT. A solução foi incubada à temperatura ambiente durante 20 minutos ao abrigo da luz. A absorvância foi depois lida num espectrofotómetro (Power Wave X, Bio Tek Instruments), no comprimento de onda de 550 nm, sendo o comprimento de onda de referência de 690 nm

3.2 Ensaio de Neutral Red

O ensaio do Vermelho Neutro (Neutral Red) permite avaliar a viabilidade celular, sendo um indicador da integridade de membrana. O Neutral Red é uma molécula neutra, com capacidade de penetrar em células vivas ou mortas. Nas células vivas, o NR acumula-se nos lisossomas, onde sofre protonação absorvendo radiação a 540 nm.

O NR foi preparado na concentração de 0.5 mg/mL em HBSS, na presença de cálcio e magnésio, sendo colocados 150 µl em contacto com as células após aspiração do meio. As placas foram depois incubadas durante 2 horas a 37°C. Seguidamente, a solução foi aspirada e foram adicionados 150 µl de solução de lise (1% de ácido acético glacial numa mistura de 1:1 etanol/água). Posteriormente, a placa foi mantida à temperatura ambiente durante 15 minutos ao abrigo da luz. A absorvância foi depois lida no espectrofotómetro no comprimento de onda de 540 nm, sendo o comprimento de onda de referência de 690 nm.

4. Estudos de captação e translocação de AuNPs

Os estudos de captação e translocação de AuNPs foram efectuados em sistema *Transwell*[®]. Este sistema é composto por dois compartimentos separados horizontalmente por uma membrana. As células Caco-2 cultivadas sobre a membrana formam uma monocamada polarizada, constituindo um modelo celular de absorção em que o compartimento superior (em contacto com a superfície apical) equivale ao lúmen intestinal, e o compartimento inferior simula a circulação sanguínea ou linfática em contacto com a superfície basolateral dos enterócitos.

4.1 Verificação da integridade e permeabilidade celular

4.1.1 Medição da resistência eléctrica transepitelial (TEER)

A resistência eléctrica transepitelial (TEER) das células cultivadas no sistema *Transwell*[®] foi medida com um voltímetro Evom2 (World Precision Instruments, EUA) (Figura 7). Este aparelho avalia a resistência da barreira transepitelial, sendo determinada pelo fluxo de iões que atravessam o espaço paracelular, e indica o estado de saúde e a confluência das células mantidas em cultura. As medições foram efectuadas a partir do momento em que as células atingiam a confluência (4^o dia), tentando efectuar-se regularmente no período de 2 em 2 dias. As determinações foram efectuadas com as células à temperatura ambiente, mantendo os eléctrodos sempre na mesma posição. Um *Transwell*[®] sem células foi utilizado como branco, de forma a determinar o valor de resistência da membrana.



Figura 7 – Imagem ilustrativa do processo de medição da TEER, em células cultivadas em sistema de cultura polarizada.

A seguinte equação foi utilizada para calcular a resistência:

$$R_{TEER} = [R_C - R_B] \times A$$

R_{TEER} representa o valor de resistência transepitelial ($\Omega \cdot \text{cm}^2$), R_C representa a resistência das células, R_B significa o valor de resistência do branco e A é o valor de área de superfície da membrana onde se encontram as células Caco-2.

4.1.2 Transporte de manitol

Como indicador da permeabilidade da monocamada celular foi determinado o fluxo bidireccional de manitol em células cultivadas em *Transwell*[®] durante 21 dias. As células foram inicialmente pré-incubadas durante 10 minutos em solução de transporte (HBSS com 25 mM de HEPES, de pH 7,4). No final do período de pré-incubação, foram adicionadas soluções de manitol marcado radioativamente (³H-manitol 12.3 Ci/mmol, Perkin Elmer, EUA) na concentração de 2.5 μM ao compartimento apical (direcção apical para basal; A→B) ou ao compartimento basal (direcção basal para apical; B→A) e solução de transporte no respectivo compartimento receptor. Em diferentes intervalos de tempo e durante 120 minutos foram recolhidas alíquotas do respectivo compartimento receptor, sendo estas substituídas por igual volume de solução de transporte.

A radioactividade das amostras foi determinada por espectrometria de cintilação (Beckman LS 6500, Beckman Instruments, Fullerton, EUA).

Os coeficientes de permeabilidade (P_{app}) expressos em cm/s foram calculados pela seguinte equação:

$$P_{app} = \frac{V_R}{AC_0 60} \times \frac{dC}{dT}$$

onde, V_R = volume do compartimento receptor (em mL), A = área da superfície do filtro (cm^2), C_0 = concentração inicial no compartimento dador (pmol/mL), dC/dT = declive da curva cumulativa da concentração de manitol (pmol/mL) ao longo do tempo (min). Os resultados obtidos correspondem à média de 3 *Transwell*[®].

4.2. Estudos de captação e translocação

Antes de se efectuarem os ensaios de captação, as células foram pré-incubadas em solução de transporte (HBSS com 25 mM de HEPES, pH 7.4) durante 10 minutos. De seguida, soluções extemporâneas de AuNPs (30 μM) com diferentes revestimentos (citrato, 11-MUA, CALNS e CALND), preparadas por diluição das soluções-mãe em solução de transporte, foram aplicadas ao compartimento apical (para avaliar o transporte na direcção apical-basal) ou ao compartimento basal (para estudar o transporte na direcção basal-apical) durante 2 horas, a 37°C, com agitação. Decorrido esse tempo, foram recolhidas alíquotas da fracção apical e basal. As células foram lavadas duas vezes com solução de transporte e recolhidas com solução de lise (0,1% Triton X100 em 5mM Tris.HCl pH 7.4). A determinação do teor proteico das fracções celulares foi efectuada pelo método de Lowry modificado (BioRad DC Protein Assay). Para a determinação de teor de ouro das amostras, procedeu-se à digestão ácida prévia com uma mistura de 1:1 de HNO_3 e HCl, durante 8 horas a 105°C. A quantificação de metal foi efectuada num espectrofotómetro de absorção atómica Perkin-Elmer modelo AAnalyst 600 com corrector de background Zeeman, equipado com AS 800 autosampler e uma impressora HL-2040. As análises foram efectuadas com tubos Perkin-Elmer THGA e software de controlo WinLab32. A temperatura de pirólise foi de 800°C e a temperatura de atomização foi de 1800°C. Quando necessário, procedeu-se à diluição da amostra com HCl a 0.2%.

O grau de internalização das AuNPs foi avaliado qualitativamente por TEM. Para o efeito, células cultivadas em placas de 6 poços, foram incubadas com 100 μM de AuNPs com diferentes revestimentos durante 24 horas a 37°C. No final da exposição, as células

foram lavadas três vezes com PBS. A fixação foi realizada com gluteraldeído (2.5% gluteraldeído em solução tampão de cacodilato de sódio 0.2 M, a pH 7.2 – 7.4). As células foram posteriormente lavadas com o mesmo tampão e sofrendo pós-fixação com tetróxido de ósmio 2%. Em seguida, as células foram desidratadas com álcool etílico (de gradação crescente de 75% a 100%), sendo efectuada a impregnação e inclusão com óxido de propileno e Epon. Os cortes ultrafinos foram observados em microscópio electrónico.

5. Tratamento estatístico dos dados

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão de três experiências independentes. Para detectar diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foi utilizado o teste ANOVA seguido pelo teste de Dunnett. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo. A análise estatística dos dados foi efectuada pelo software GraphPad Prism versão 5.01.

CAPÍTULO III

Resultados e Discussão

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Síntese e Caracterização de AuNPs

A solução coloidal de nanopartículas de ouro obtida apresentou-se homogénea, com uma coloração vermelha (figura 8A). Quando analisada por espectrofotometria de UV/Vis, apresentou um máximo de absorção de 520 nm, sob a forma de uma banda plasmónica bem definida. O espectro indica também tratar-se de uma amostra com uma dispersão reduzida e bem estabilizada pelo agente de revestimento (citrato) (figura 8B).

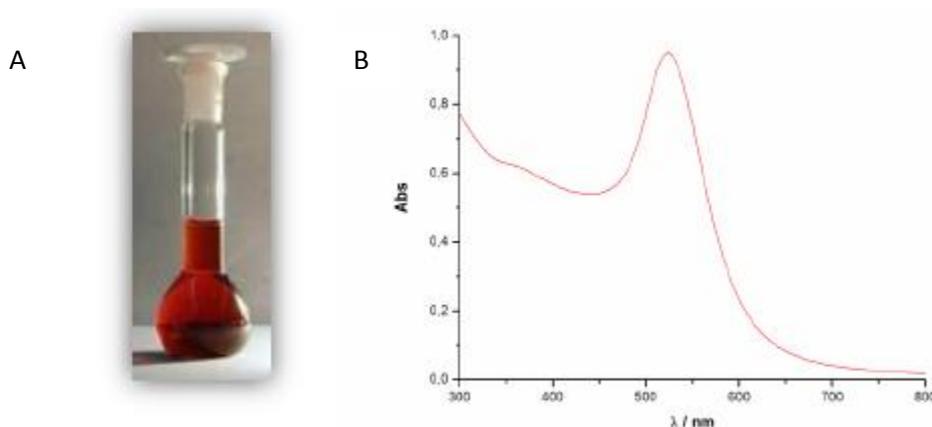


Figura 8. A) Aspecto geral da solução coloidal de AuNPs obtida pelo método de redução por citrato. B) Espectro de absorção de UV/Vis da solução coloidal de AuNPs, apresentando a respectiva banda plasmónica característica (520 nm).

A análise da suspensão de AuNPs por T.E.M. permitiu verificar que as suspensões de nanopartículas obtidas exibiam uma forma esférica, um tamanho homogéneo e uma baixa dispersibilidade, não se observando muitos agregados (figura 9).

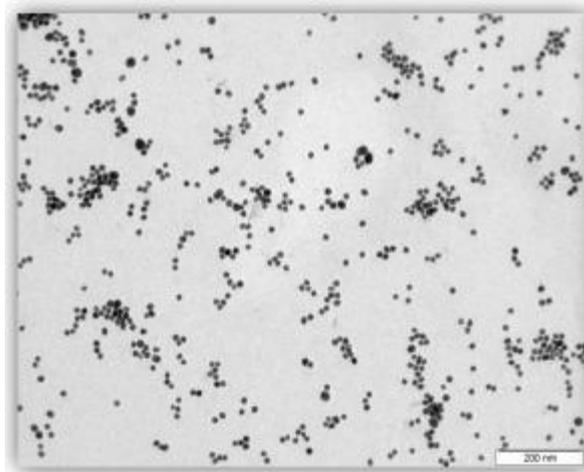


Figura 9 – Imagem representativa da análise por T.E.M. de uma amostra de solução coloidal de AuNPs revestidas com citrato.

O diâmetro das AuNPs com diferentes agentes de revestimento foi determinado pela medição da difracção dinâmica de luz (D.L.S.) Os resultados encontram-se na tabela 2 e mostram que após funcionalização há um aumento do diâmetro das AuNPs relativamente às AuNPs revestidas a citrato (AuNPs-Cit). Os valores encontrados para as AuNPs-Cit rondam os 23 nm, enquanto que nas diferentes AuNPs funcionalizadas os diâmetros médios rondam os 33 e 35 nm. Estes resultados demonstram que o processo de funcionalização foi eficiente, com uma substituição do citrato pelo agente de revestimento e que as AuNPs funcionalizadas com 11-MUA e com os pentapéptidos CALNS e CALND apresentam um tamanho muito semelhante.

Tabela 2 – Diâmetros das AuNPs com diferentes revestimentos determinados por D.L.S.

AuNPs + Agentes de revestimento	Diâmetro/nm
Citrato	22,4 ± 5,7
11 – MUA	33,2 ± 9,8
CALND	35,1 ± 9,9
CALNS	34,9 ± 9,6

O potencial zeta das AuNPs foi determinado e os resultados obtidos encontram-se apresentados na tabela 3. Todas as AuNPs têm um valor de potencial zeta negativo e muito semelhante entre si. O facto dos valores obtidos se situarem na ordem dos -40 mV é indicativo de soluções coloidais com boa estabilidade, ou seja, menor tendência de agregação.

Tabela 3: Valores do potencial zeta das AuNPs com diferentes revestimentos.

AuNPs + Agentes de revestimento	Potencial ζ / mV
Citrato	$-44,7 \pm 7,5$
11 – MUA	$-37,3 \pm 8,4$
CALND	$-47,1 \pm 6,0$
CALNS	$-40,5 \pm 7,0$

Os resultados fornecidos por D.L.S. indicaram que o diâmetro médio das nanopartículas de citrato é de aproximadamente 23 nm. Nas restantes nanopartículas revestidas o aumento no diâmetro é de cerca de 10 nm (entre 33 e 35 nm). Este aumento deve-se ao tamanho do agente de revestimento, que ao ligar-se à superfície da nanopartícula contribui para o aumento do raio desta. Esse aumento é semelhante devido ao tamanho também semelhante dos agentes de revestimento entre si.

2. Avaliação do Potencial Citotóxico das AuNPs funcionalizadas em células Caco-2

Os potenciais efeitos citotóxicos das AuNPs foram avaliados num modelo celular de epitélio intestinal humano, a linha celular Caco-2. As células foram expostas a concentrações de AuNPs (1 a 100 μM) preparadas em meio de cultura sem soro, durante 24, 48, 72 ou 96 horas. No final de cada exposição, a viabilidade foi avaliada pelos ensaios de MTT e do vermelho neutro (NR). Conforme se encontra representado nas figuras 10 e 11, para as concentrações e tempos de exposição testados, as AuNPs-Cit parecem não exercer efeitos citotóxicos nas células Caco-2.

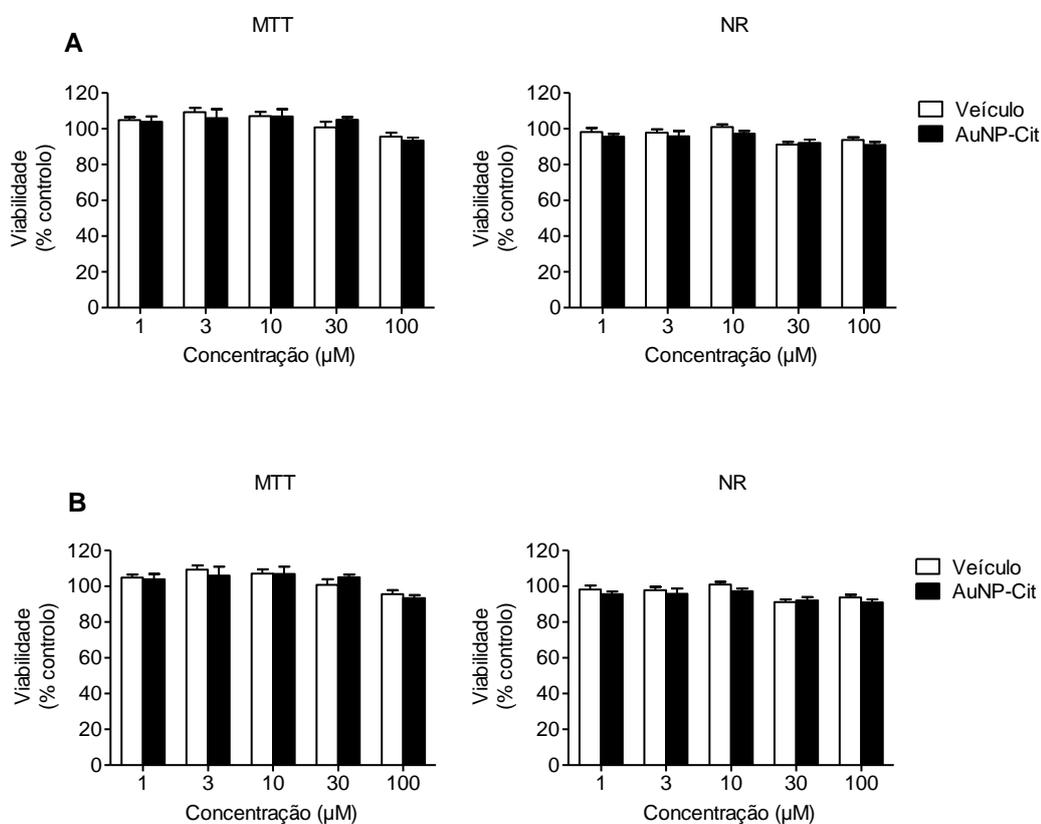


Figura 10: Efeitos das AuNPs revestidas com citrato (AuNP-Cit) e respectivos veículos na viabilidade das células Caco-2 após (A) 24 e (B) 48 horas de exposição a diferentes concentrações. A viabilidade celular foi avaliada pelos métodos de redução do MTT e incorporação do vermelho neutro (NR) e os resultados, em % de controlo (células não tratadas), encontram-se expressos como média \pm erro padrão de 3 experiências independentes ($n = 8$).

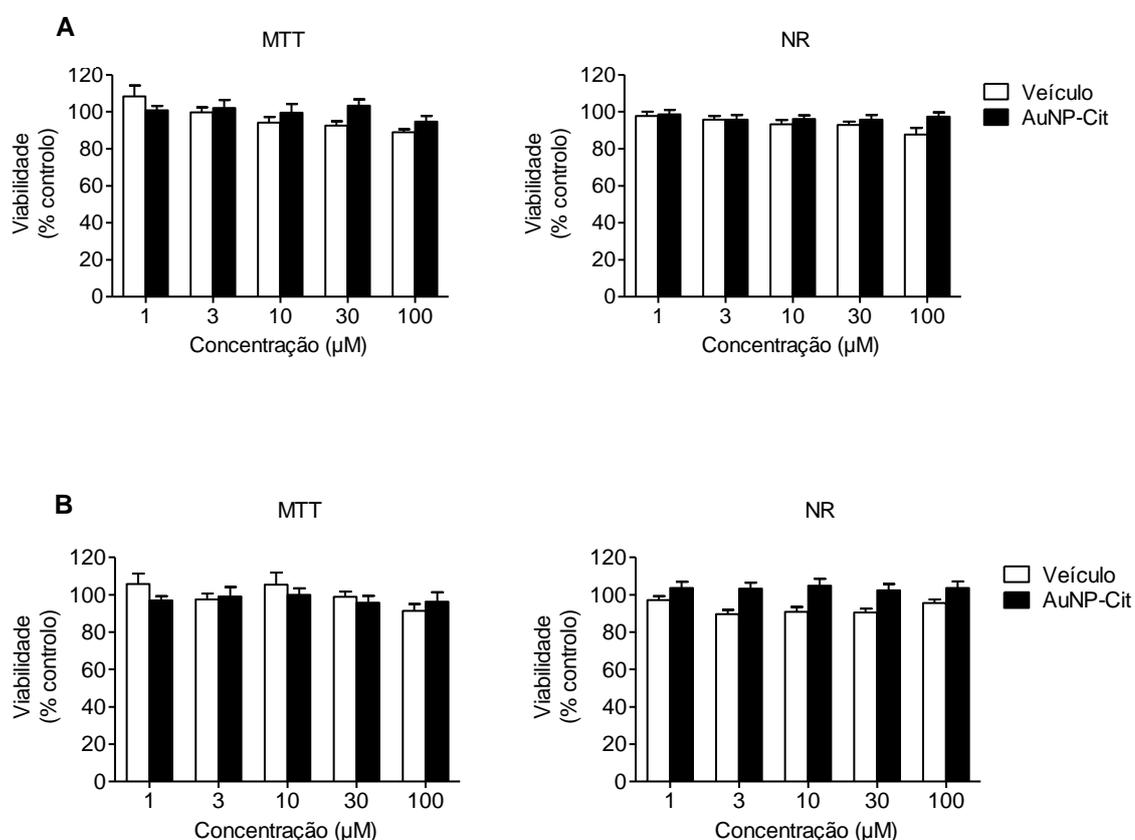


Figura 11: Efeitos das AuNPs revestidas com citrato (AuNP-Cit) e respectivos veículos na viabilidade das células Caco-2 após (A) 72 e (B) 96 horas de exposição a diferentes concentrações. A viabilidade celular foi avaliada pelos métodos de redução do MTT e incorporação do vermelho neutro (NR) e os resultados, em % de controlo (células não tratadas), encontram-se expressos como média \pm erro padrão de 3 experiências independentes ($n = 8$).

Não foram detectadas alterações significativas na morfologia celular após 24 horas de exposição às AuNPs-Cit. Imagens de microscopia óptica mostram que o tamanho e a forma das células parecem não ser afectados pela presença das NPs (fig. 12). Após 96 horas, as células incubadas com AuNPs mantinham a mesma morfologia que células em que as AuNPs estavam ausentes do meio. A presença de agregados é evidente, sobretudo na concentração de AuNPs mais elevada (figs. 12C e 12 F).

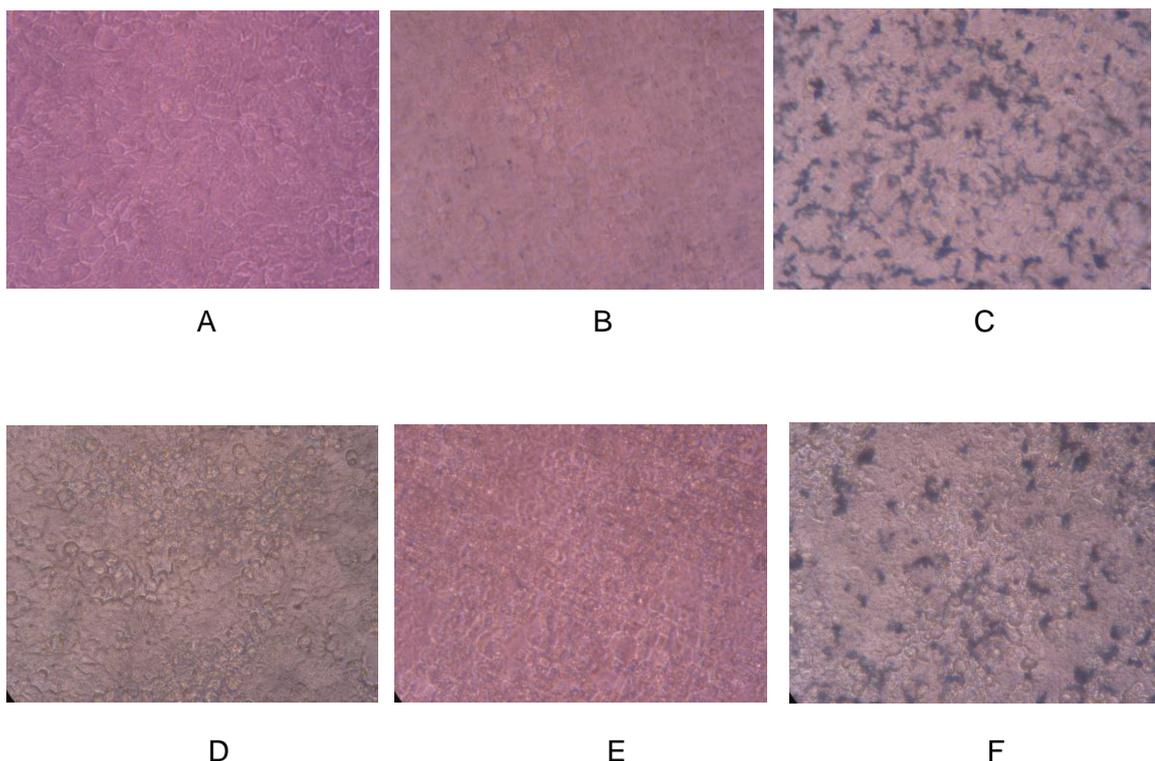


Figura 12: Efeito das AuNPs-Cit na morfologia das células Caco-2. Após 24 horas de exposição, as células foram observadas num microscópio de contraste de fases com uma ampliação de 400x. (A) Controlo, (B) 10 μM AuNP-Cit e (C) 100 μM . Após 96 horas de exposição, As células foram novamente observadas ao microscópio às 96 horas com uma ampliação de 400x. (D) Controlo, (E) 10 μM AuNP-Cit e (F) 100 μM .

A análise de ambos os resultados dos ensaios de viabilidade, por MTT e NR parece descartar qualquer fenómeno de citotoxicidade associado às AuNPs-Cit. Estes resultados são concordantes com os obtidos por Connor (63) que observou a ausência de citotoxicidade de AuNPs-Cit com diâmetros de 4 e 18 nm revestidas com citrato em células K562 até uma concentração máxima de 250 μM . Apesar do tamanho das AuNPs e da linha celular ser diferente, o revestimento de citrato parece não estar associado a fenómenos de citotoxicidade. Porém, Uboldi e colaboradores (67) demonstraram que AuNPs-Cit com um tamanho de 11 e 25 nm provocam uma diminuição entre 30 a 40% na viabilidade de células alveolares A549, comparativamente a AuNPs de 9,5 nm em que o revestimento de citrato foi removido por filtração e diálise. A linha celular NCIH441, também testada com as mesmas AuNPs, não sofreu qualquer tipo de alteração na sua viabilidade. Depreende-se que a susceptibilidade a efeitos citotóxicos de AuNPs revestidas por citrato poderá também dever-se às características das células.

De modo a compreender a influência da funcionalização das AuNPs na citotoxicidade, a partir das AuNPs-Cit, utilizadas como referência, foram sintetizadas AuNPs com novos revestimentos (11-MUA, CALNS e CALND).

A funcionalização com 11-MUA pode ser uma estratégia para obter AuNPs mais estáveis e com menor capacidade de agregação (81). De forma a avaliar o potencial citotóxico das AuNPs funcionalizadas com 11-MUA, o mesmo tipo de abordagem metodológica foi utilizado. À semelhança do observado para AuNPs de referência (AuNPs-Cit), as AuNPs revestidas com 11-MUA parecem não alterar a viabilidade celular, após 24 e 48 horas e nas concentrações testadas (figura 13).

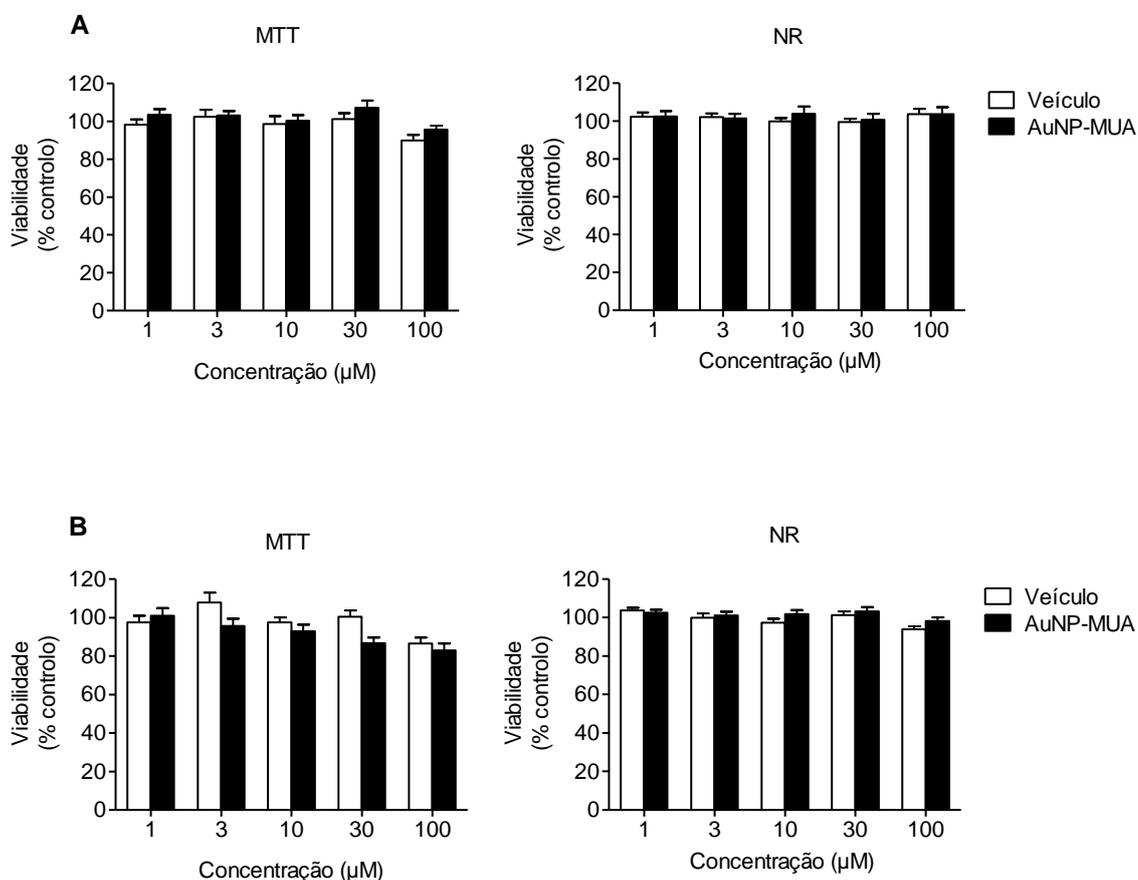


Figura 13: Efeitos das AuNPs revestidas com 11-MUA (AuNP-MUA) e respectivos veículos, na viabilidade das células Caco-2 após (A) 24 e (B) 48 horas de exposição a diferentes concentrações. A viabilidade celular foi avaliada pelos métodos de redução do MTT e incorporação do vermelho neutro (NR) e os resultados, em % de controlo (células não tratadas), encontram-se expressos como média \pm erro padrão de 3 experiências independentes ($n = 8$).

Para tempos de exposição ainda mais longos (72 e 96 horas), continua a observar-se ausência de citotoxicidade (figura 14).

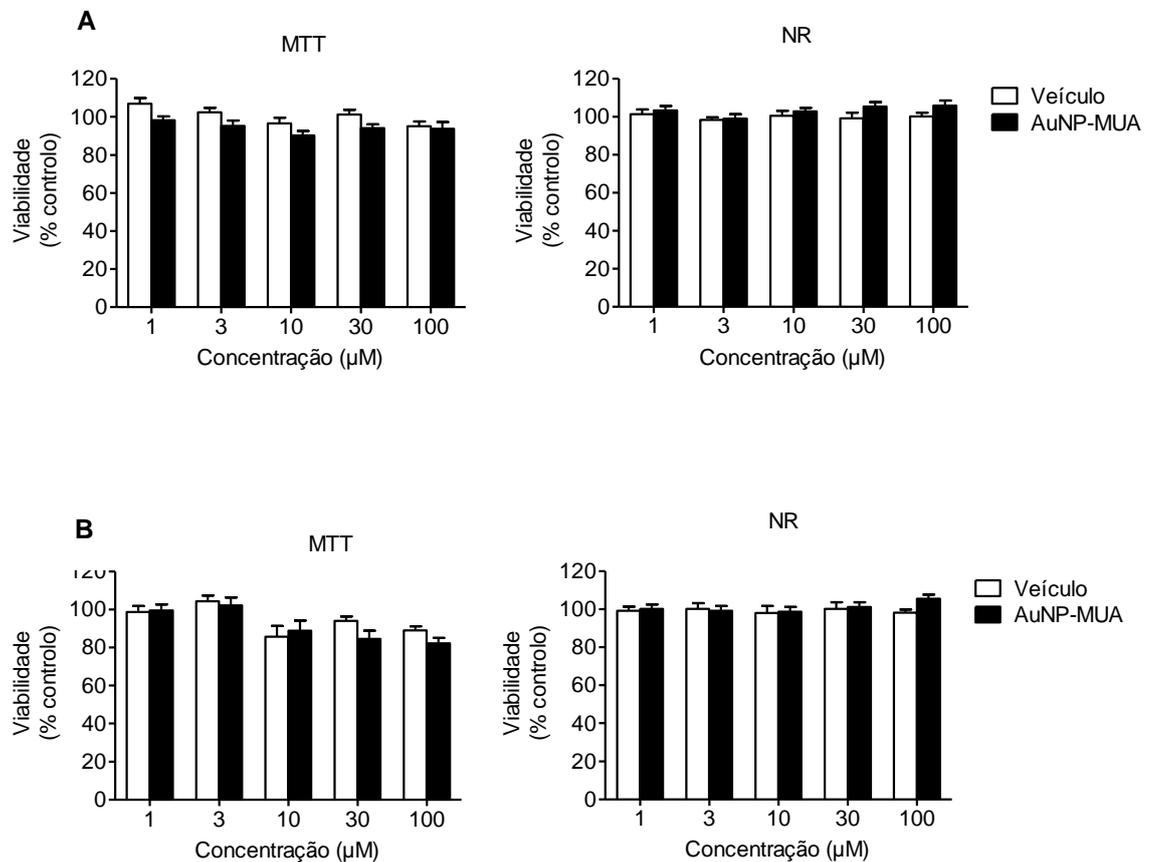


Figura 14: Efeitos das AuNPs revestidas com 11-MUA (AuNP-MUA) e respectivos veículos, na viabilidade das células Caco-2 após (A) 72 e (B) 96 horas de exposição a diferentes concentrações. A viabilidade celular foi avaliada pelos métodos de redução do MTT e incorporação do vermelho neutro (NR) e os resultados, em % de controlo (células não tratadas), encontram-se expressos como média \pm erro padrão de 3 experiências independentes (n = 8).

A morfologia celular, após 24 horas de exposição às AuNPs-MUA, não parece sofrer alterações, conforme observado pelas imagens de microscopia óptica (fig.15). Na exposição mais longa (96 horas), o tamanho e a forma das células aparentemente não sofreram alterações. Agregados podem ser observados na concentração de AuNPs mais elevada, em ambos os tempos (fig. 15 C e 15 F).

11-MUA

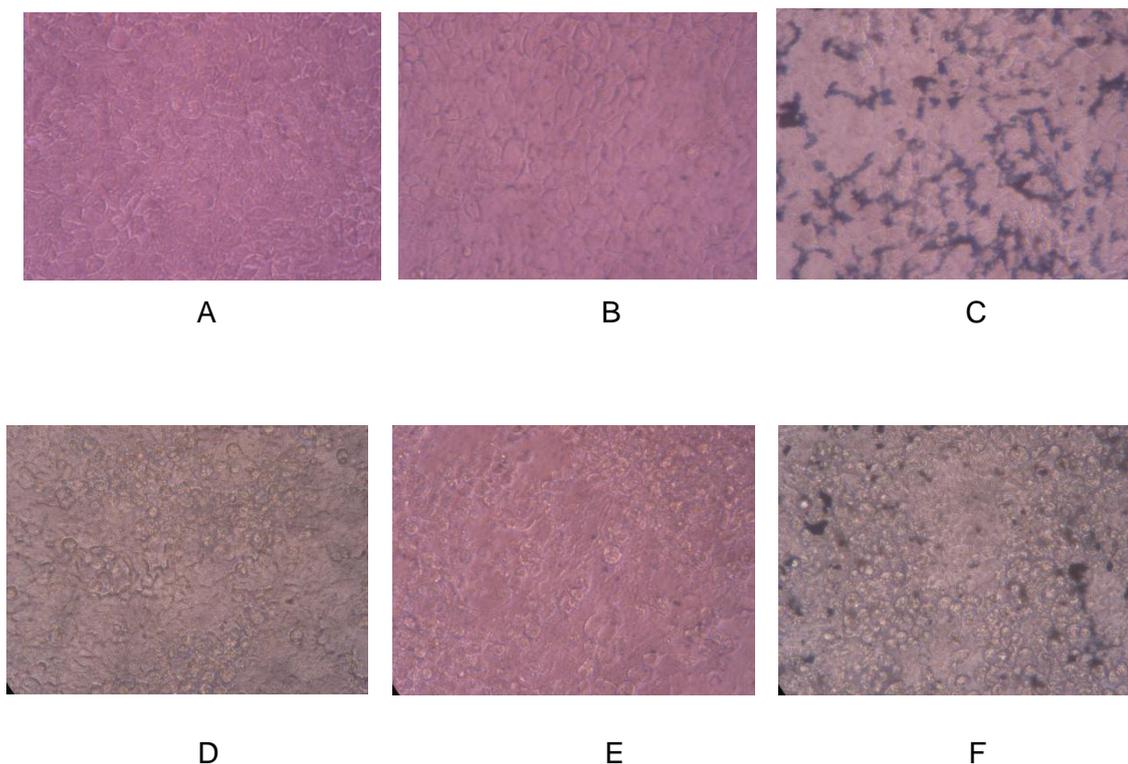


Figura 15: Efeito das AuNPs-MUA na morfologia das células Caco-2. Após 24 horas de exposição, as células foram observadas num microscópio de contraste de fases com uma ampliação de 400x. (A) Controlo, (B) 10 μM AuNP-MUA e (C) 100 μM AuNP-MUA. Após 96 horas de exposição, As células foram novamente observadas ao microscópio às 96 horas com uma ampliação de 400x. (D) Controlo, (E) 10 μM AuNP-MUA e (F) 100 μM AuNP-MUA.

A funcionalização de AuNPs com péptidos permite a obtenção de nanopartículas estáveis, hidrossolúveis, com propriedades análogas às proteínas (28). Estas características podem ser aproveitadas para promover o reconhecimento celular de AuNPs e consequentemente a sua internalização (29). Contudo, o conhecimento sobre efeitos tóxicos de AuNPs revestidas com péptidos ainda é limitado. Neste estudo, foram utilizados os pentapéptidos CALNS e CALND. O aminoácido terminal confere a estes péptidos diferentes propriedades: ambos são hidrófilos e polares, contudo o aminoácido serina (S) apresenta uma carga negativa – 1 em pH 7 enquanto o ácido aspártico (D) apresenta carga negativa – 2 (29). Na tentativa de apurar potenciais efeitos tóxicos destes agentes, a análise da viabilidade de AuNPs revestidas com pentapéptidos CALND e CALNS foi efectuada. Para os tempos estabelecidos, observou-se ausência de citotoxicidade induzida por AuNPs revestidas com CALND (figs. 16 e 17).

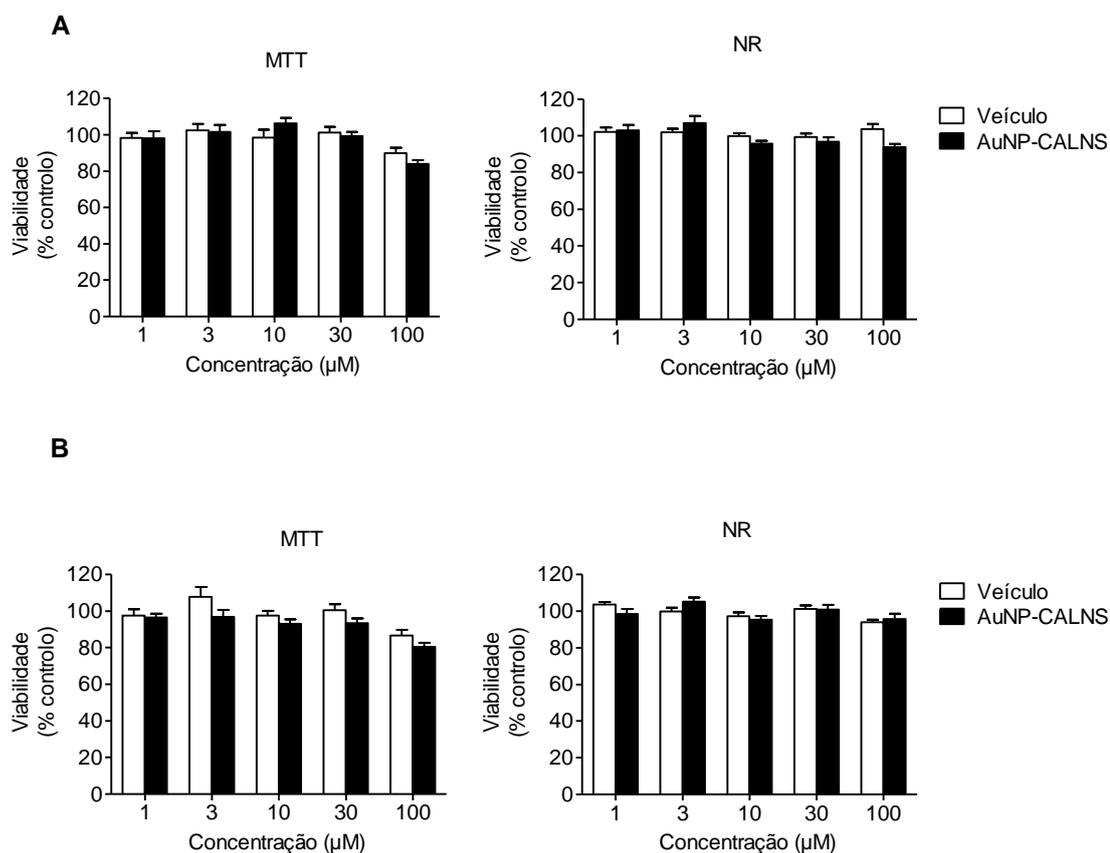


Figura 16: Efeitos das AuNPs revestidas com CALNS (AuNP-CALNS) e respectivos veículos na viabilidade das células Caco-2 após (A) 24 e (B) 48 horas de exposição a diferentes concentrações. A viabilidade celular foi avaliada pelos métodos de redução do MTT e incorporação do vermelho neutro (NR) e os resultados, em % de controlo (células não tratadas), encontram-se expressos como média \pm erro padrão de 3 experiências independentes (n = 8).

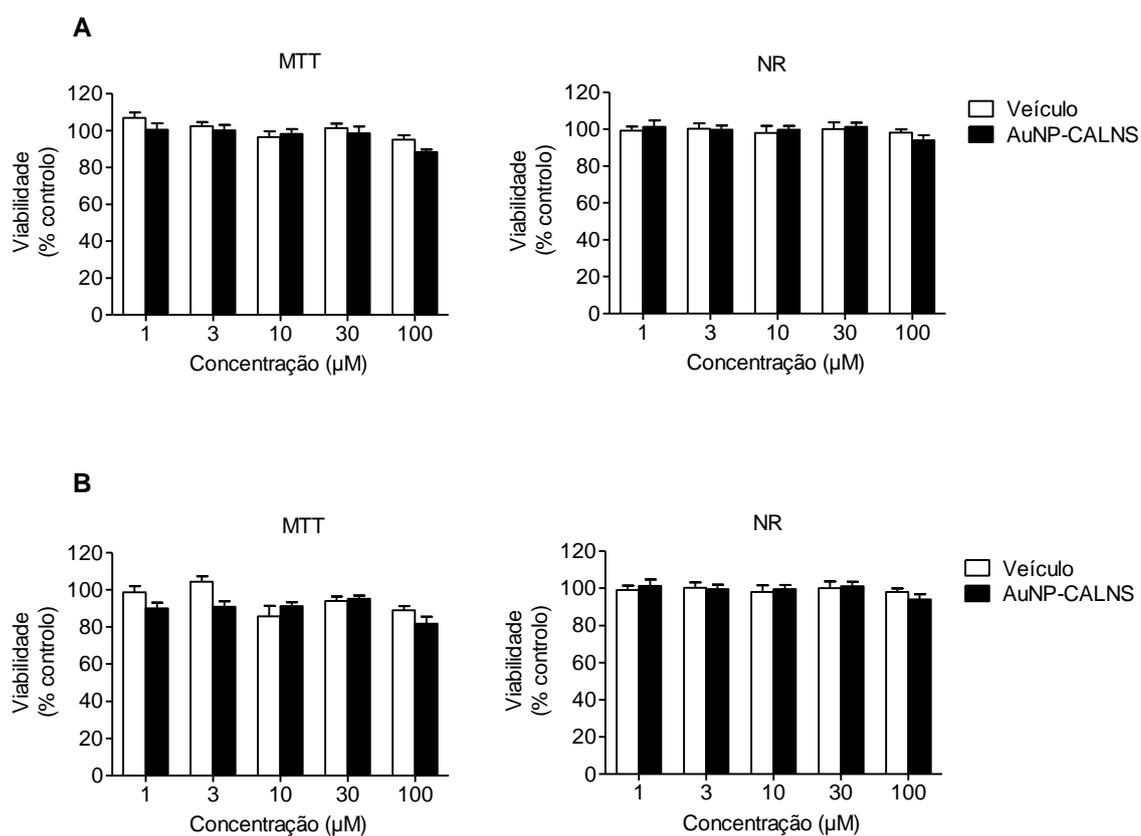


Figura 17: Efeitos das AuNPs revestidas com CALNS (AuNP-CALNS) na viabilidade das células Caco-2 após (A) 72 e (B) 96 horas de exposição a diferentes concentrações e respectivos veículos. A viabilidade celular foi avaliada pelos métodos de redução do MTT e incorporação do vermelho neutro (NR) e os resultados, em % de controlo (células não tratadas), encontram-se expressos como média \pm erro padrão de 3 experiências independentes (n = 8).

A morfologia celular pareceu não sofrer alterações após 24 e 96 horas de exposição a AuNPs-CALNS (fig. 18). As imagens de microscopia óptica revelam que as células mantiveram a sua forma e o seu tamanho, mesmo na presença de agregados na concentração de AuNPs mais elevada (figs. 18C e 18F).

CALNS

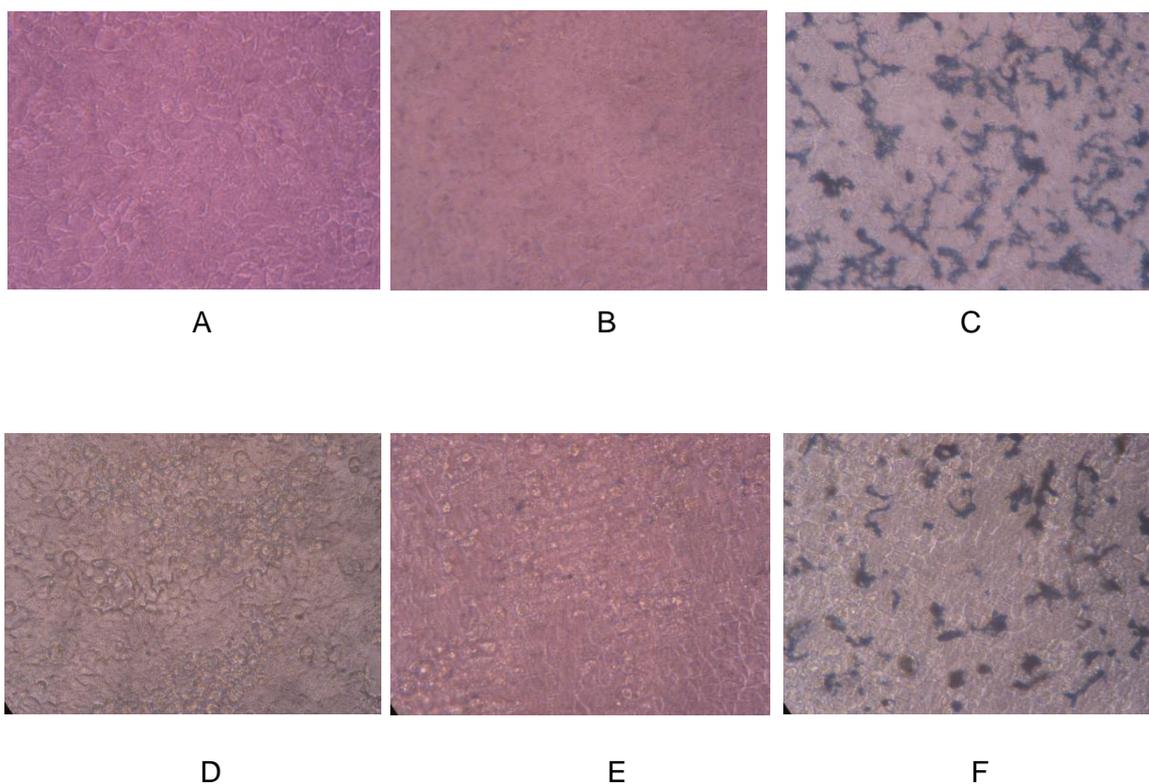


Figura 18: Efeito das AuNPs-CALNS na morfologia das células Caco-2. Após 24 horas de exposição, as células foram observadas num microscópio de contraste de fases com uma ampliação de 400x. (A) Controlo, (B) 10 μM AuNP-CALNS e (C) 100 μM AuNP-CALNS. Após 96 horas de exposição, As células foram novamente observadas ao microscópio às 96 horas com uma ampliação de 400x. (D) Controlo, (E) 10 μM AuNP-CALNS e (F) 100 μM AuNP-CALNS.

À semelhança do observado com AuNPs-CALNS, AuNPs revestidas com CALND não pareceram causar efeitos citotóxicos em células Caco-2, nos tempos e concentrações testados (figs 19 e 20).

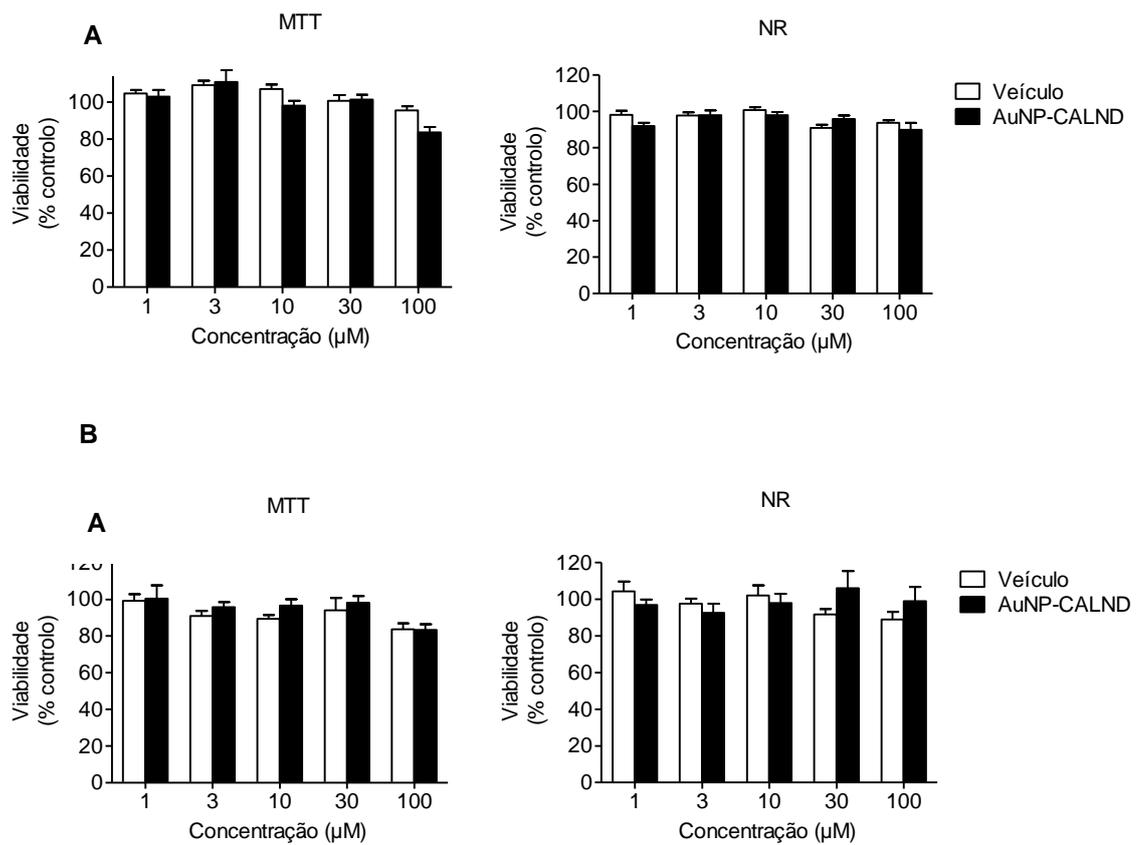


Figura 19: Efeitos das AuNPs revestidas com CALND (AuNP-CALND) na viabilidade das células Caco-2 após (A) 24 e (B) 48 horas de exposição a diferentes concentrações e respectivos veículos. A viabilidade celular foi avaliada pelos métodos de redução do MTT e incorporação do vermelho neutro (NR) e os resultados, em % de controlo (células não tratadas), encontram-se expressos como média \pm erro padrão de 3 experiências independentes (n = 8).

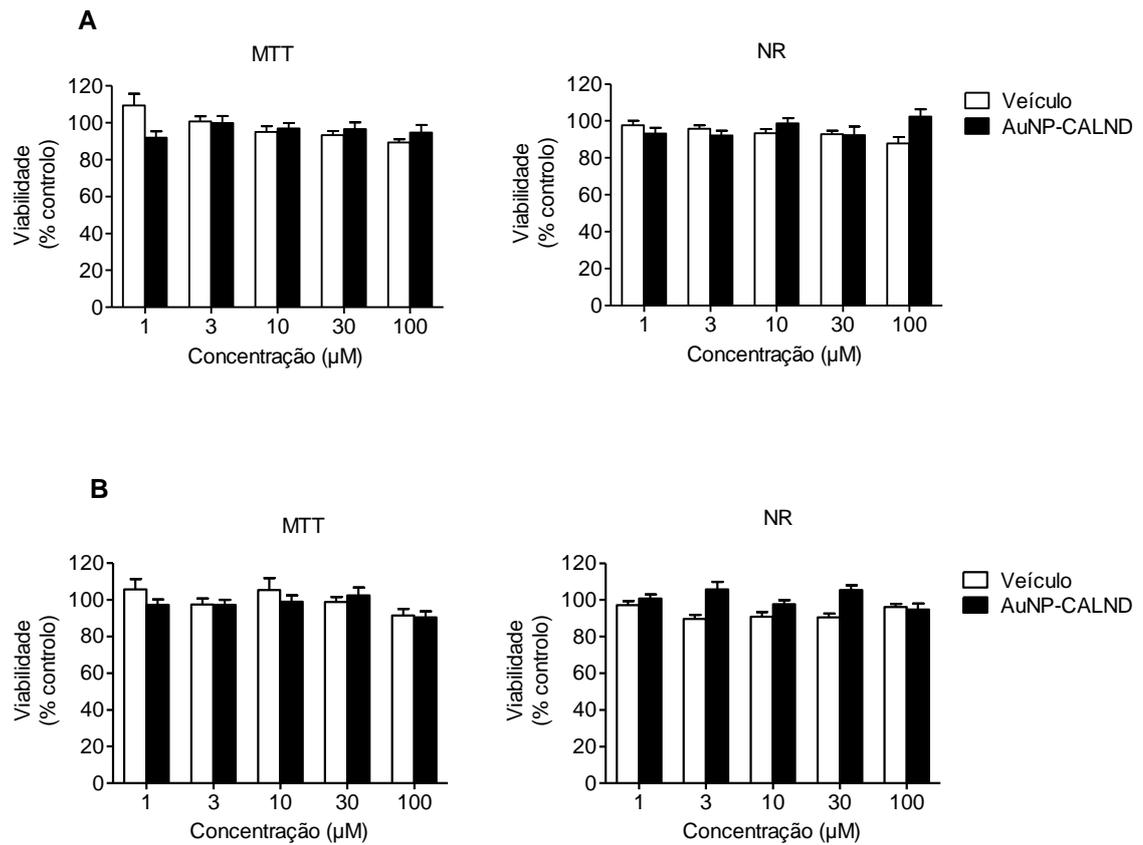


Figura 20: Efeitos das AuNPs revestidas com CALND (AuNP-CALND) na viabilidade das células Caco-2 após (A) 72 e (B) 96 horas de exposição a diferentes concentrações e respectivos veículos. A viabilidade celular foi avaliada pelos métodos de redução do MTT e incorporação do vermelho neutro (NR) e os resultados, em % de controle (células não tratadas), encontram-se expressos como média \pm erro padrão de 3 experiências independentes ($n = 8$).

Após 24 horas de incubação com AuNPs revestidas com CALND, as células não apresentavam alterações na sua morfologia, mantendo a sua forma e o seu tamanho (fig. 21). O mesmo foi comprovado às 96 horas. Na concentração mais elevada, foi possível observar a presença de agregados. (figs. 21 C e 21 F).

CALND

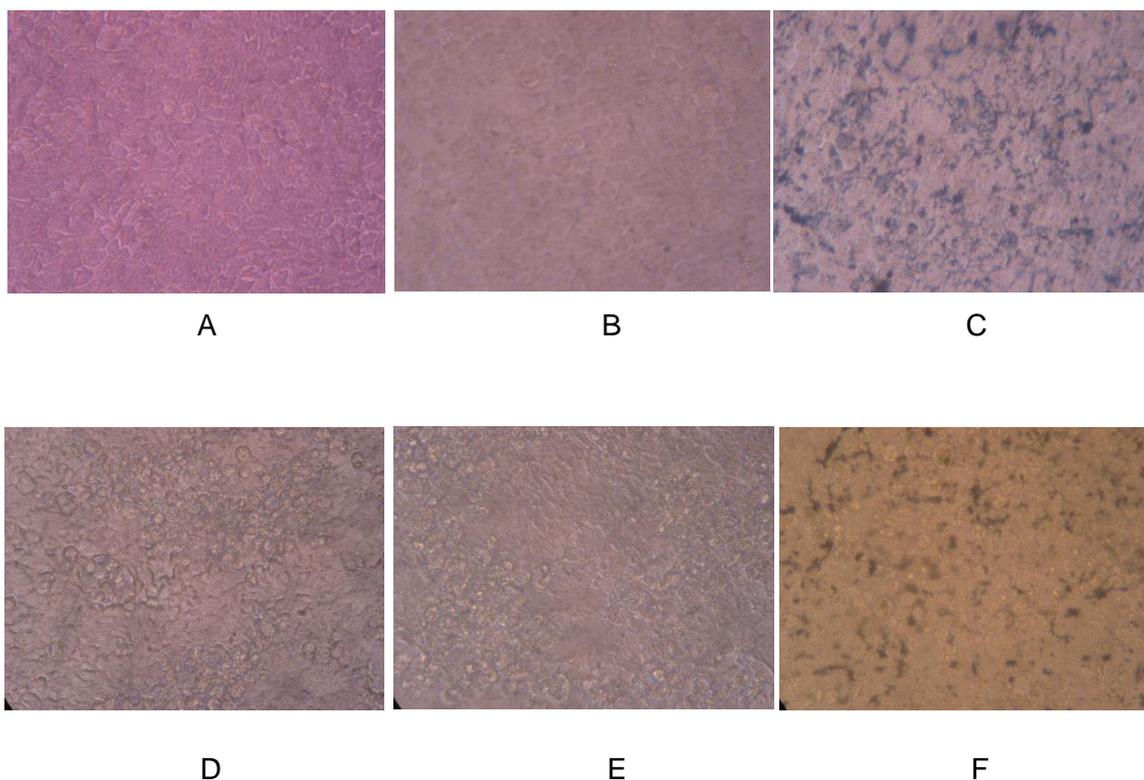


Figura 21: Efeito das AuNPs-CALND na morfologia das células Caco-2. Após 24 horas de exposição, as células foram observadas num microscópio de contraste de fases com uma ampliação de 400x. (A) Controlo, (B) 10 μM AuNP-CALND e (C) 100 μM AuNP-CALND. Após 96 horas de exposição, As células foram novamente observadas ao microscópio às 96 horas com uma ampliação de 400x. (D) Controlo, (E) 10 μM AuNP-CALND e (F) 100 μM AuNP-CALND.

A funcionalização das AuNPs de referência (AuNPs-Cit) com os diferentes revestimentos utilizados neste trabalho (MUA, CALNS e CALND) parece não estar associada a fenómenos de toxicidade em células Caco-2. A análise morfológica por microscopia óptica sugere que a morfologia celular parece não ser afectada pela exposição de diferentes nanopartículas. Para evitar a associação de proteínas que pudessem de alguma forma contribuir para alterações no perfil de citotoxicidade, não foram utilizadas proteínas no meio de incubação (meio de cultura sem soro bovino fetal) visto as AuNPs terem a capacidade de se ligarem a elas e conseqüentemente serem mais facilmente internalizadas através de receptores celulares.

Ainda que em estudos efectuados em pontos quânticos e não em AuNPs, a toxicidade de NPs revestidas com 11-MUA foi comprovada por Laaksonen e colaboradores (26), que avaliaram a citotoxicidade de pontos quânticos de CdSe/ZnS revestidos por 11-MUA em

diversas linhas celulares. A toxicidade de pontos quânticos revestidos com MUA é um processo dependente da concentração de NPs.

Uma vez que o revestimento por péptidos é considerado uma óptima estratégia de internalização celular (85), a citotoxicidade de NPs funcionalizadas por péptidos tem sido cada vez mais estudada. A citotoxicidade de AuNPs revestidas por péptidos foi efectuada por Sun e colaboradores utilizando AuNPs revestidas com CALNNR₈, em células HeLa (27). Baixas concentrações (0,02 até 0,08 nM) não afectam a viabilidade celular, enquanto concentrações mais elevadas (0,32 nM) provocam a morte em 95% das células. Tkachenko e colaboradores, utilizaram péptidos de origem vírica conjugados com nanopartículas de ouro, testando-as em células HepG2. Apesar da diferente capacidade de penetração, a viabilidade celular também não sofreu alterações (58). Contudo, ao utilizarem linhas celulares diferentes, os perfis de citotoxicidade foram diferentes: péptidos de origem viral diminuem a viabilidade de células HeLa em 20% enquanto que a viabilidade de células 3T3/NIH diminui apenas 5% (59). Shukla e colaboradores testaram AuNPs de tamanho semelhante às utilizadas neste ensaio revestidos com poli-L-lisina em macrófagos RAW 264.7 constatando a ausência de citotoxicidade ao longo de 72 horas (62). Apesar dos revestimentos utilizados no presente trabalho terem sido diferentes, os resultados obtidos parecem estar em concordância com os resultados obtidos pelos autores anteriormente referidos. A citotoxicidade de AuNPs revestidas por péptidos parece depender da sua sequência aminoacídica e do tipo de linha celular utilizada.

Os tipos de revestimentos utilizados neste trabalho não parecem causar citotoxicidade em células Caco-2. A escolha de revestimentos, no âmbito da nanomedicina, recairá sobre aqueles que provem a ausência de citotoxicidade. Assim, será possível utilizar NPs, por exemplo como veículos de fármacos, com um perfil de segurança adequado. Contudo, na análise da citotoxicidade o revestimento das NPs é apenas um factor a ter em consideração. A forma, o tamanho e mesmo o modo como os ensaios *in vitro* são conduzidos têm de ser analisados com ponderação. Devido às propriedades únicas das NPs, a interpretação correcta de ensaios de viabilidade é fundamental (83). Ensaio clássico como o MTT, LDH e NR têm sido amplamente utilizados na literatura para reportar fenómenos de citotoxicidade. Contudo, NPs devidamente caracterizadas podem sofrer alterações quando são introduzidas num novo meio aquando da realização de ensaios de citotoxicidade: factores como o pH, presença de iões e moléculas como iões como aminoácidos e proteínas podem ter um impacto significativo na dispersão, agregação, aglomeração e na própria superfície reaccional das NPs (84). As NPs também podem interferir com os reagentes e alterar os resultados dos resultados dos

64

ensaios utilizados. A harmonização dos ensaios actualmente utilizados e a validação por corroboração permitirá estabelecer testes toxicológicos fiáveis.

3. Estudos de captação e translocação

O grau de translocação e internalização das AuNPs com diferentes revestimentos foi determinado em células Caco-2 cultivadas durante 21 dias em sistemas *Transwell*[®]. Foi feita uma avaliação prévia da resistência eléctrica transepitelial (TEER) e do transporte paracelular de manitol, dois indicadores da integridade e permeabilidade da monocamada celular. A TEER foi monitorizada ao longo de 21 dias de cultura, encontrando-se os resultados representados na figura 22. Como esperado, observou-se um aumento progressivo da TEER ao longo do processo de diferenciação celular, que ao 21^o dia atingiu valores na ordem dos 500-600 $\Omega \cdot \text{cm}^2$.

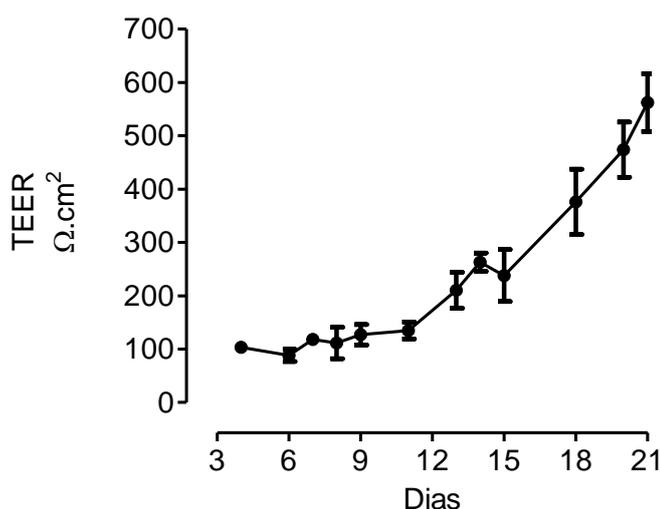


Figura 22: Variação da média de valores de TEER em células Caco-2 ao longo de 21 dias de cultura. Resultados expressos como média \pm erro-padrão da média, $n=6$.

Nas mesmas células, o transporte bidireccional de manitol foi avaliado e os coeficientes de permeabilidade obtidos encontram-se na tabela 4. O transporte de manitol foi semelhante nas duas direcções e os valores de P_{app} são os expectáveis para este tipo de soluto (85). Estes resultados demonstram que as condições de cultura utilizadas neste trabalho possibilitam o estudo do transporte e internalização de AuNPs.

Tabela 4: Coeficientes de Permeabilidade (P_{app}) do Manitol em células Caco-2 com 21 dias de cultura.

Soluto	Direcção	P_{app} $\times 10^{-6}$ (cm/s)
^3H -Manitol	A \rightarrow B	1.10 ± 0.078
	B \rightarrow A	0.72 ± 0.018

A \rightarrow B: Apical para Basal; B \rightarrow A: Basal para Apical

Resultados expressos como média \pm erro padrão da média (n=3)

Células com valores de TEER $> 500 \Omega \cdot \text{cm}^2$ foram utilizadas para estimar a translocação e internalização de AuNPs. Na figura 23, encontra-se representada a percentagem de translocação das AuNPs funcionalizadas do compartimento dador para o receptor (A) e a percentagem de retenção celular das mesmas (B).

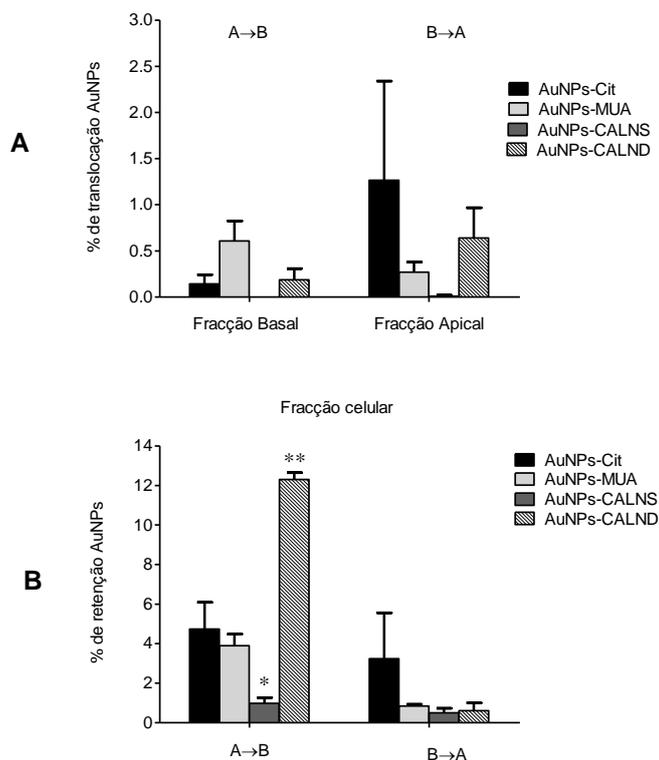


Figura 23: (A) Percentagem de translocação de AuNPs e (B) percentagem de retenção celular após 2 horas de incubação com as AuNPs funcionalizadas (30 μM), em células Caco-2. Os estudos foram realizados na direcção apical-basal (A \rightarrow B) e basal-apical (B \rightarrow A). Os resultados encontram-se expressos como média \pm erro padrão da média (n=3). * $p < 0.05$ vs AuNPs-Cit; ** $p < 0.0001$ vs AuNPs-Cit.

Os resultados mostram que o fluxo transepitelial das AuNPs em ambas as direcções é reduzido e parece não haver diferenças entre as diferentes AuNPs testadas. Esta reduzida capacidade das AuNPs de atravessarem o epitélio intestinal já foi descrita por outros autores (44, 46, 85, 86).

A funcionalização parece ter influência no grau de internalização das AuNPs pelas células Caco-2. Conforme representado na Figura 22 B, a captação apical foi maior para AuNPs revestidas com CALND e as menos internalizadas pelas células foram as AuNPs-CALNS, no entanto o mesmo perfil de internalização não foi observado quando as AuNPs foram adicionadas ao compartimento basal.

Vários trabalhos demonstraram que a internalização das AuNPs é mediada por endocitose (59, 60, 64). As diferenças observadas no perfil de acumulação das AuNPs podem ser explicadas por uma distribuição assimétrica dos componentes envolvidos na captação das nanopartículas. Por outro lado, o facto das AuNPs serem pouco captadas no domínio basolateral da célula está concordante com o observado nos estudos de biodistribuição onde AuNPs administradas por via endovenosa, não são encontradas no intestino (85, 86) Na tentativa de minimizar a influência de proteínas na internalização das nanopartículas nas células (uma vez que as nanopartículas se podem ligar às proteínas e serem facilmente internalizadas), os ensaios foram efectuados na ausência de proteínas no meio, sendo a internalização observada apenas dependente do revestimento. Apesar da ausência de citotoxicidade, observa-se que o revestimento é determinante no grau de internalização das AuNPs. Um revestimento que apresente uma estrutura química com maior compatibilidade para um receptor membranar específico permitirá que a AuNP seja mais internalizada que um revestimento com menor afinidade para esse receptor.

Com o objectivo de observar a extensão de internalização intracelular, após terem sido incubadas durante 24 horas com nanopartículas de diferentes revestimentos, as células Caco-2 foram observadas ao microscópio electrónico (figs. 24 a 26). Quando as células foram incubadas com AuNPs, encontraram-se nanopartículas no espaço extracelular. No interior das células, as nanopartículas aglomeravam-se em espaços pontualmente em espaços delimitados por membranas, levantando-se a hipótese de serem endossomas. Não foram identificadas AuNPs livres no citoplasma ou no núcleo. As células que captaram ouro apresentavam uma menor definição da membrana celular relativamente ao controlo.

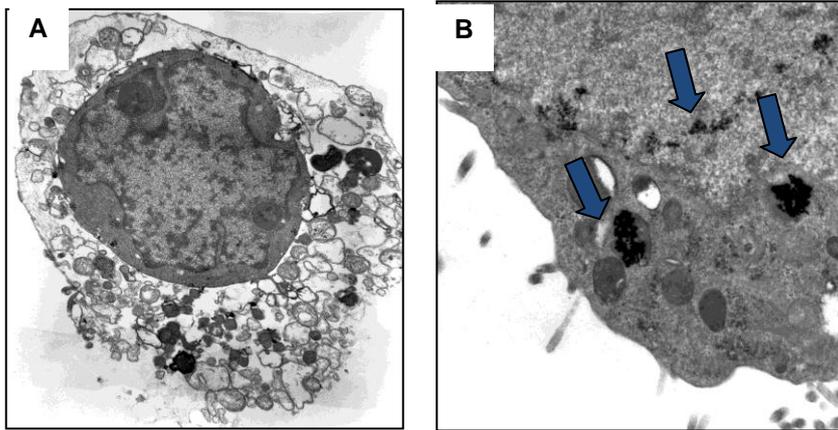


Figura 24: Imagens de T.E.M., células Caco-2, na ausência de nanopartículas (controle) (A) e após tratamento com de AuNPs-Cit a 100 μM (B). As setas indicam a presença de AuNPs.

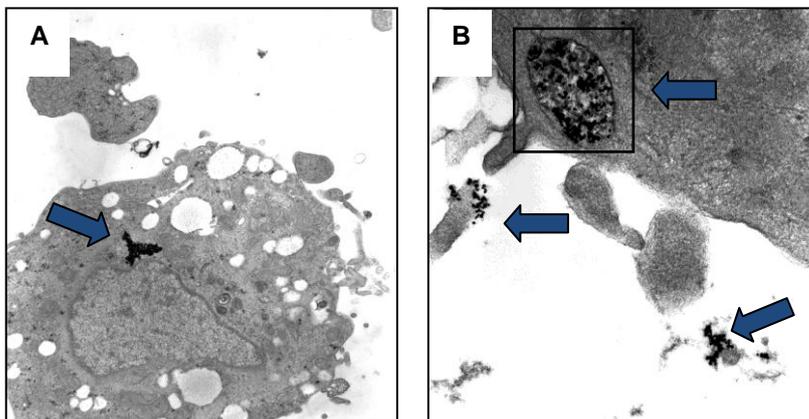


Figura 25: Imagens de T.E.M. de células Caco-2 após tratamento com AuNP-MUA (A) e AuNP-CALND (B) a 100 μM . As setas indicam a presença de AuNPs. Na figura 27B, é possível observar um aglomerado de AuNPs numa estrutura delimitada por membrana (caixa).

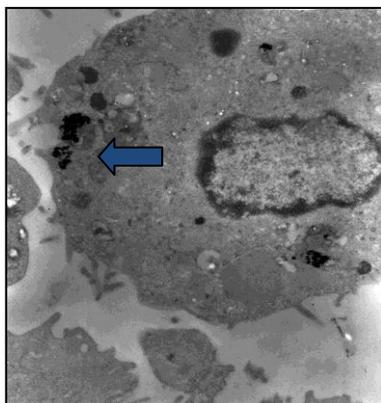


Figura 26: Imagens de T.E.M. a partir de células Caco-2, após tratamento com AuNP-CALNS, a 100 μM , durante 24 horas.

A análise qualitativa do grau de internalização por T.E.M. revelou que AuNPs revestidas por CALND parecem ter maior capacidade de penetração celular, seguidas por AuNPs revestidas por citrato e por 11-MUA. As AuNPs de CALNS parecem ser a menos internalizadas. Estes resultados são concordantes com os observados no estudo de translocação e internalização. O revestimento é sem dúvida fundamental para a internalização das nanopartículas e para o seu destino intracelular. Tkachenko e colaboradores, ao utilizarem AuNPs revestidas por fragmentos de proteínas virais, observaram-nas na região perinuclear e no interior do núcleo (59,60). O grau de internalização das AuNPs dependeu do revestimento das AuNPs, como observado neste trabalho. Pernodet localizou AuNPs em vesículas lisossómicas, sem o seu revestimento prévio de citrato, não as encontrando no núcleo (64). Uboldi não observou AuNPs dispersas no citosol mas apenas na região peri-nuclear (67). No presente trabalho também não foi possível identificar AuNPs na região nuclear.

Os diferentes graus de internalização das AuNPs poderão explicar-se com base na estrutura química que constitui o revestimento. Apesar de muito semelhantes entre si, os pentapéptidos CALND e CALNS diferem do aminoácido terminal, traduzindo-se essa diferença no valor de carga. O facto do pentapéptido CALND possuir um maior número de carga (-2) em relação ao CALNS (-1) provavelmente será reponsável pela sua maior capacidade de internalização nas células Caco-2. Este pentapéptido poderá ser o revestimento mais promissor para promover a internalização de AuNPs nas células intestinais. A confirmação deste facto está pendente de novos ensaios que poderão surgir, como por exemplo em ensaios em outros modelos de epitélio intestinal ou mesmo de ensaios *in vivo*.

CAPÍTULO IV

Conclusão

CONCLUSÃO

As nanopartículas de ouro, graças às suas características únicas (como o tamanho reduzido, possibilidade de funcionalização e presença de banda plasmónica), têm sido cada vez mais investigadas no âmbito da medicina com o objectivo de estabelecer novas aplicações em métodos de diagnóstico e terapêuticos. Devido à natureza inerte do metal de que são constituídas, seria de supôr que seriam isentas de toxicidade. Contudo, o conhecimento sobre o potencial efeito nocivo das nanopartículas de ouro tem sido revelado ao longo dos anos. Apesar de estudos contraditórios existentes na literatura, e da dificuldade em cruzar dados obtidos devido a especificidades inerentes aos ensaios efectuados, sabe-se que as nanopartículas de ouro podem ter efeitos lesivos sobre determinadas células. Também se sabe que diferentes características como a forma, o tamanho e o revestimento têm influência na sua toxicidade.

Neste trabalho, procurou-se avaliar o potencial citotóxico, a translocação e acumulação de nanopartículas de ouro em células Caco-2. As células Caco-2 são amplamente utilizadas na pesquisa de novos fármacos uma vez que têm a notável capacidade de recriar os principais atributos do epitélio intestinal humano. Células Caco-2 foram expostas a diferentes concentrações de AuNPs (1 a 100 μ M) revestidas com citrato, 11-MUA, CALND e CALNS durante 24, 48, 72 e 96 horas. Nestas condições estabelecidas, não foram observados efeitos citotóxicos. O estudo da translocação e internalização das mesmas AuNPs funcionalizadas foi realizado após 2 horas de incubação com as nanopartículas e permitiu concluir a capacidade das AuNPs em atravessarem as células é muito reduzida. Contudo, a influência do revestimento manifesta-se no grau de internalização: nanopartículas de ouro revestidas com CALND são mais facilmente internalizadas que as restantes, sendo as CALNS as menos internalizadas. Pode levantar-se a hipótese de que existirá uma distribuição assimétrica dos componentes envolvidos no processo de captação das partículas nos dois domínios da célula. Mais estudos serão necessários para confirmar se este fenómeno é exclusivo das Caco-2 ou comuns a outros modelos de epitélio intestinal.

Bibliografia

1. NNI, National Nanotechnology Initiative, 2010 (última visualização em 29 de Setembro de 2010), www.nano.gov
2. Sahoo S, Labhasetwar V, Nanotech approaches to drug delivery and imaging, *Drugs Discovery Today*, 2003, Vol. 8 No. 24, 1112 - 1200
3. Emerich D, Thanos C, The pinpoint of nanoparticle-based drug delivery and molecular diagnosis, *Biomolecular Engineering*, 2006, 23, 171 – 184
4. Holister P, Weener J-W, Román C, Harper T, Nanoparticles, *Científica*, 2003
5. Junghanns J-W, Müller R, Nanocrystal technology, drug delivery and clinical applications, *International Journal of Nanomedicine*, 2008, 3, 295-309
6. Sanvincens N, Marco M, Multifunctional nanoparticles – properties and prospects of their use in human medicine, *Trends in Biotechnology*, 2008, Vol. 26, No. 8, 425-433
7. Caruthers SD, Wickiline SA, Lanza GM, Nanotechnological applications in medicine, *Current Opinion on Biotechnology*, 2007, 18(1), 26 -30
8. Koo O, *et al*, Role of nanotechnology in targeted drug delivery and imaging: a concise review, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2005, 1, 193 -212
9. Freitas Jr R, What is nanomedicine?, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2005, 1, 2 – 9
10. Yang, J, *et al*, Multifunctional magneto-polymeric nanohybrids for targeted detection and synergistic therapeutic effects on breast cancer, *Angewandte Chemical International Edition*, 2007, 46, 8836-8839
11. Daniel, M-C, Astruc D, Gold nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size Related Properties, and Applications toward Biology, Catalysis and Nanotechnology, *Chemical Reviews*, 2004, 104, 293 – 346
12. Fadeel B, Garcia-Bennett A, Better safe than sorry: Understanding the toxicological properties of inorganic nanoparticles for manufactured for biomedical applications, *Advanced drug delivery reviews*, 2010, 62, 362 – 374
13. Roduner E, Size matters: why nanomaterials are different, *Chemical Society Reviews*, 35, 583 – 592
14. Pearce M, Melanko J, Salem A, Multifunctional Nanorods for Biomedical Applications, *Pharmaceutical Research*, 2007, Vol. 24, No 12, 2335 – 2352

15. Millstone J, Georganopoulou D, Xu X, Wei W, Li S, Mirkin C, DNA-Gold Triangular Nanoprism Conjugates, *Small*, 2008, Vol 4. No 12, 2176 – 2180
16. Hirsch L, *et al*, Nanoshell-mediated near-infrared thermal therapy of tumors under magnetic resonance guidance, *Proceedings of the National Academy of American Sciences*, Vol. 100, No 23, 13549 – 13554
17. Skrabalak S, *et al*, Gold nanocages: Synthesis, Properties and Applications, *Accounts of Chemical Research*, 2008, Vol. 41, No 12, 1587 – 1595
18. Brust M, *et al*, Synthesis of Thiol-derivatised Gold Nanoparticles in a Two-phase Liquid-Liquid System, *Journal of the Chemical Society*, 1994, 801 - 802
19. Hu M, *et al*, Gold nanostructures: engineering their plasmonic properties for biomedical applications, *Chemical Society reviews*, 2006, 35, 1084-1094
20. Ghosh P, *et al*, Gold nanoparticles in delivery applications, *Advanced drug delivery reviews*, 2008, 60, 1307 – 1315
21. Turkevich J, Stevenson PC, Hillier J, A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold", *Discussions of the Faraday Society*. 1951, No 11, 55-75
22. Frens G, Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions, *Nature (London) Phys. Sci.*, 1973, 241, 20-22
23. Homberger M, Simon U, On the application potential of gold nanoparticles in nanoelectronics and biomedicine, *Philosophical Transitions of the Royal Society*, 2010, 368, 1405-1453
24. Sperling R, Parak W, Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles, *Philosophical Transitions of the Royal Society*, 2010, 368, 1333-1383
25. Owens D, *et al*, Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles, *International Journal of Pharmaceutics* , 2006, 307, 93 -102
26. Laaksonen T, Ahonen P, Johans C, Kontturi K, Stability and Electrostatics of Mercaptoundecanoic Acid-Capped Gold Nanoparticles with Varying Counterion Size, *Chemphyschem*, 2006, 7, 2143 – 2149
27. Sun L, Liu D, Wang Z, Functional Gold Nanoparticle-Peptide Complexes as Cell-Targeting Agents, *American Chemical Society*, 2008, 24, 10293 -10297
28. Lévy R, Peptide-capped gold nanoparticles: towards artificial proteins, *Chembiochem*, 2006, Vol. 7 No 8, 1141 – 1145
29. Lévy R, *et al*, Rational and combinatorial design of peptide capping ligands for gold nanoparticles, *Journal of the American Chemical Society*, 2004, Vol. 126, No 32, 10076 - 10084

30. Jones C, Grainger D, *et al*, In vitro assessments of nanomaterial toxicity, *Advanced Drugs Delivery Reviews*, 2009, 61, 438 – 436
31. Boisselier E, Astruc D, Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics therapies and toxicity, 2009, *Chemical Society Reviews*, 2009, 38, 1759-1782
32. Hong R, Han G, Fernandez JM, Kim BJ, Forbes NS, Rotello VM, Glutathione-mediated delivery and release using monolayer protected nanoparticles carries, *Journal of the American Chemical Society*, 2006, 128, 1078 – 1079
33. Polizzi M, Stasko N, Schoenfish M, Water-soluble nitric oxide-releasing gold nanoparticles, *Langmuir*, 2007, 23, 4938 – 4943
34. Han G, *et al*, Controlled recovery of the transcription of nanoparticle-bound DNA by intracellular concentrations of glutathione, *Bioconjugated Chemistry*, 2005, 16, 1356 -1359
35. Li J, *et al*, In vitro cancer cell imaging and therapy using transferrin-conjugated gold nanoparticles, *Cancer Letters*, 2009, 274, 319 – 326
36. Goel R, Shah N, Visaria R, Paciotti GF, Bischof JC, Biodistribution of TNF-alpha-coated gold nanoparticles in a in vivo model system, *Nanomedicine*, 2009, 4, 401 - 410
37. Bhattacharya R, Mukherjee P, Biological properties of “naked” metal nanoparticles, *Advanced drug delivery reviews*, 2008, 60, 1289 – 1306
38. Mukherjee P, *et al*, Antiangiogenic Properties of Gold Nanoparticles, *Clinical Cancer Res*, 2005, 11 (9), 3530 – 3534
39. Dixit V, Van den Bossche J, Sherman DM, Thompson DH, Andres RP, Synthesis and grafting of thioctic acid-PEG-folate conjugates onto Au nanoparticles for selective targeting of folate receptor-positive tumor cells, *Bioconjugate chemistry*, 2006, 17(3), 603 - 609
40. Chamberland D, *et al*, Photoacoustic tomography of joints aided by an Etanercept-conjugated gold nanoparticle contrast agent—an *ex vivo* preliminary rat study, *Nanotechnology*, 2008, 1 -7
41. Pissuwan D, Cortie C H, Valenzuela S M, Cortie M B, Functionalised gold nanoparticles for controlling pathogenic bacteria, *Trends in Biotechnology*, 783
42. Baptista P, *et al*, Antiangiogenic Gold nanoparticles for the development of clinical diagnosis methods, *Anal Bioanalytical Chemistry*, 2008, 391, 943-950
43. Neely A, *et al*, Ultrasensitive and highly selective detection of Alzheimer's disease biomarker using two-photon Rayleigh scattering properties of gold nanoparticle, *ACS nano*, 2009, 9, 2834 -2840

44. Bowman MC, Ballard TE, Ackerson CJ, Feldheim DL, Margolis DM, Melander C, Inhibition of HIV fusion with multivalent gold nanoparticles, *Journal of the American Chemical Society*, 2008, 130(22), 6896-7
45. Baptista PV, Koziol-Montewka M, Paluch-Oles J, Doria G, Franco R, Gold-nanoparticle-probe-based assay for rapid and direct detection of Mycobacterium tuberculosis DNA in clinical samples, *Clinical Chemistry*, 2006, 52, 1433 – 1434
46. Hagens W, *et al*, What do we (need to) know about the kinetic properties of nanoparticles in the body?, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2007, 49, 217-219
47. Fischer H, Chan W, Nanotoxicity: the growing need for in vitro studies, *Current Opinion on Biotechnology*, 2007, 18, 565 – 571
48. Oberdöster G, Oberdöster E, Oberdöster G J, Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles, *Environmental Health Perspectives*, 2005, 113 (7), 823 – 839
49. Sonavane G, *et al*, In vitro Permeation of gold nanoparticles through rat skin and rat intestine: Effect of particle size, *Colloids and Surfaces Biointerfaces*, 2008, 65, 1 -10
50. Cho W-S, *et al*, Acute toxicity and pharmacokinetics of 13 nm-sized PEG coated nanoparticles, *International Journal of Pharmaceutics*, 2006, 307, 93 -102
51. Sonavane G, *et al*, Biodistribution of colloidal gold nanoparticles after intravenous administration: Effect of particle size, *Colloids and Surfaces Biointerfaces*, 2008, 66, 274 -280
52. Auffan M, Rose J, Wiesner M, Bottero J, Chemical stability of metallic nanoparticles: A parameter controlling their potential cellular toxicity in vivo, *Environmental Pollution*, 2009, 157, 1127-1133
53. Tian X, *et al*, Potential Health Impacts of Nanoparticles, *Annual Reviews of Public Health*, 2009, 137 -150
54. Suh, W, *et al*, Nanotechnology, nanotoxicology, and neuroscience, *Progress in Neurobiology*, 2009, 87, 133 – 170
55. Aillon K, Xie Y, El-Gendy N, Berkland C, Forrest M, Effects of nanomaterial physicochemical properties on *in vivo* toxicity, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2009, 61, 457-466
56. Decuzzi P, Ferrarri M, The role of specific and non-specific interactions in receptor mediated endocytosis of nanoparticles, *Biomaterials*, 2007, 28, 2915 – 2922
57. Dobrovskaja M, *et al*, Interaction of colloidal gold nanoparticles with human blood: effects of particle size and analysis of plasma protein binding profiles, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2005, 106 - 117

58. Tkachenko A, *et al*, Multifunctional gold nanoparticle-peptide complexes for nuclear targeting. *Journal of American Chemical Society*, 2003, 125, 4700 – 4701
59. Tkachenko A, *et al*, Cellular trajectories of peptide-modified gold particle complexes: comparison of nuclear localization signals and peptide transduction domains, *Bioconjugate Chemistry*, 2004, 15, 482 – 490
60. Thomas M, Klibanov A, Conjugation to gold nanoparticles enhances polyethylenimine's transfer of plasmid DNA into mammalian cells, *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 16, 9138-9143
61. Goodman C, *et al*, Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains. *Bioconjugate Chemistry*, 2004, 4, 1881 -1887
62. Shukla, *et al*, Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: a microscopic overview, *Langmuir* 2005, 10644 - 10654
63. Connor E, *et al*, Gold Nanoparticles Are Taken Up by Human Cells but Do Not Cause Acute Cytotoxicity, *Small*, 2005, Vol. 1, No. 3, 325-327
64. Pernodet N, Adverse effects of citrate/gold nanoparticles on human dermal fibroblasts, *Small*, 2006, 2, 766 – 733
65. Patra H, *et al*, Cell selective response to gold nanoparticles, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2007, 3, 111-119
66. Pan Y, *et al*, Size-Dependent Cytotoxicity of Gold Nanoparticles, *Small*, 2007, 3, No. 11, 1941 – 1949
67. Uboldi C, *et al*, Gold nanoparticles induce cytotoxicity in the alveolar type-II cell lines A549 and NCIH441, *Particle and Fibre Toxicology*, 2009, 6:18
68. Buttlerworth K, *et al*, Evaluation of cytotoxicity and radiation enhancement using 1.9 nm gold particles: potential application for cancer therapy, 2010, *Nanotechnology*, 21, 295 – 101
69. Jin H, *et al*, Size-Dependent Cellular Uptake and Expulsion of Single-Walled Carbon Nanotubes: Single Particle Tracking and a Generic Uptake Model for Nanoparticles, *American Chemical Society*, 2009, Vol. 3, No. 1, 149 – 158
70. Chitrani B, *et al*, Determining the Size and Shape Dependence of Gold Nanoparticle Uptake into Mammalian Cells, *Nano Letters*, 2006, Vol. 6, No. 4, 662 – 668
71. Chitrani B, Chan W, Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes, *Nano letters*, 2007, Vol 7 No 6, 1542 – 1550

72. Alkilany A, *et al*, Cellular uptake and cytotoxicity of gold nanorods: molecular origin of cytotoxicity and surface effects, *Small*, 2009, Vol 5, No 6, 701 - 708
73. Shah P, Jogani V, Bagchi T, Misra A, Role of Caco-2 Cell Monolayers in prediction of Intestinal Drug Absorption, *Biotechnology Progress*, 2006, 22, 186 – 198
74. Elsby R, Surry DD, Smith VN, Gray AJ, Validation and application of Caco-2 assays for the in vitro evaluation of development candidate drugs as substrates or inhibitors of P-glycoprotein to support regulatory submissions, *Xenobiotica*, 2008, 38, 1140-1164.
75. Hilgers A, Conradi R, Burton P, Caco-2 cells Monolayers as a Model for Drug Transport Across the Intestinal Mucosa, *Pharmaceutical Research*, Vol. 7, nº 9, 902 -910
76. Artursson P, Palm K, Luthman K, Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport, *Advanced drug deliveries*, 2001, 27 – 43
77. Braun A, *et al*, Cell cultures as tools in biopharmacy, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2000, 11, Suppl. 2, S51 - S60
78. Koeneman A, *et al*, Toxicity and cellular responses of intestinal cells exposed to titanium dioxide, 2009, *Cell Biology and Toxicology*, Vol. 26 Nº 3, 225 - 238
79. Koeneman A, Experimental approach for an in vitro toxicity assay with non-aggregated quantum dots, *Toxicology in Vitro*, 2009, 23, 955 -962
80. Soares L, Síntese e Funcionalização de Nanopartículas Metálicas com Péptidos, *Departamento de Química da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto*, 2009
Shiohara A, Hoshino A, Hanaki K, Suzuki K, Yamamoto K, On the cytotoxicity caused by quantum dots, *Microbiology and Immunology*, 2004, Vol. 48, No 9, 669 – 675
81. Koch M, *et al*, Transport of Surface-Modified Nanoparticles Through Cell Monolayers, *ChemBiochem*, 2005 Vol. 6 nº 2, 337 – 345
82. Tran C, Monteiro-Riviere N, Nanotoxicology: Characterization, Dosing and Health Effects, *Informa healthcare*, 2007
83. Boverhof D, Raymond D, Nanomaterial characterization: considerations and needs for hazard assessment and safety evaluation, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2010, 10, 953 -961
84. Markowska M, Oberle R, Juzwin S, Hsu CP, Gryszkiewicz M, Streeter AJ, Optimizing Caco-2 cell monolayers to increase throughput in drug intestinal absorption analysis, *Journal of Pharmacology and Toxicology Methods*, 2001, Vol. 46 No1, 51-55.

85. Balasubramanian SK, *et al*, Biodistribution of gold nanoparticles and gene expression changes in the liver and spleen after intravenous administration in rats, *Biomaterials*, 2010, Vol. 31 No. 8, 2034-2042.
86. Semmler-Behnke M, *et al*, Biodistribution of 1.4 and 18 nm gold particles in rats, *Small*, 2008 Vol 4 No 12, 2018 - 2111