



Helena Catarina Inocência Teixeira de Faria

# **Estudo Comparativo de Citotoxicidade e Internalização de Nanopartículas de Ouro com Diferentes Revestimentos**

**Dissertação de Mestrado em Toxicologia Analítica, Clínica e Forense  
Apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto**

**Trabalho realizado sob a orientação de:**

Professora Doutora Helena Maria da Ferreira Costa Ferreira Carmo

Professora auxiliar da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

**Porto, Setembro de 2010**

*É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA DISSERTAÇÃO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.*

*Aos meus pais*



## Agradecimentos

Os nossos caminhos fazem-se caminhando... no fim desta caminhada, sinto que não caminhei só. Para todas as pessoas que caminharam comigo e me ensinaram a olhar para a vida através da ciência, expresso aqui a minha gratidão.

À Professora Doutora Maria de Lurdes Bastos, agradeço a disponibilidade com que sempre me recebeu e todo o apoio que, durante estes dois anos, me dispensou.

À Professora Doutora Helena Carmo, minha orientadora, expresso um agradecimento muito especial pela ajuda que me deu na estruturação e desenvolvimento deste trabalho. Sem a sua leitura atenta e crítica, não seria tão rico, quer do ponto de vista literário quer do ponto de vista científico.

À minha muito querida Engenheira Elisa, nem uma seara do tamanho do Mundo, com uma concentração imensa de papoilas, chegaria para agradecer a ajuda que me deu, na procura do Au internalizado nas HepG2. Um beijinho desta sua “papoila”.

À Leonor Soares fico imensamente grata pela sua disponibilidade na síntese das Nanopartículas de Ouro, utilizadas neste estudo.

Ao Professor Doutor José Alberto Duarte, o meu muito obrigada pela valiosa colaboração prestada na obtenção das microfotografias das células HepG2.

À Diana agradeço as preciosas dicas para lidar com as células HepG2, que passaram a ser as minhas filhotas caprichosas.

À Renata agradeço a força de vontade e o carinho com que adoptou a minha “sombra”, mesmo em dias de nevoeiro. Foi com o teu apoio que aprendi as técnicas de viabilidade celular. Nunca esquecerei a tua óptima ajuda.

Ao Professor Doutor Fernando Remião estou grata pela calma que transmite e pelas palavras encorajadoras com que sempre nos brindou: “Trabalhar até à exaustão!”. E no fim do trabalho... bolinhos de morangos, que bela refeição!

À Maria João, minha colega e amiga, não tenho palavras para agradecer. Tu foste sempre a minha bússola e a prova que os mais novos nos ensinam muito. Foste também a “filha” querida que empurrou a cadeira de rodas quando os meus pés triplicaram. Há atitudes que não se pagam porque não têm preço, devolvem-se com muito carinho.

À Sílvia agradeço a honestidade e o fazer-me acreditar que ainda há pessoas muito genuínas. Sempre que precisei paraste para me ouvir. Obrigada.

Aos meus colegas de mestrado, incluindo a Maria João, agradeço do fundo do coração o carinho com que me trataram e a facilidade com que me integraram no grupo. Nunca vou esquecer os momentos bons que passámos juntos.

À D. Júlia, agradeço a boa disposição com que sempre lidou comigo.

Por último, quero agradecer aos meus pais o apoio, o carinho, a disponibilidade, a paciência, as críticas construtivas que eu achava destrutivas, enfim a ajuda incondicional que só os pais sabem dar aos filhos. Bem hajam por caminharem sempre ao meu lado, amortecendo as minhas quedas e aplaudindo os meus êxitos. Eu amo-vos e considero-vos os meus melhores amigos.

## Resumo

Durante os últimos anos, as nanopartículas (NPs) produzidas por engenharia têm sido amplamente utilizadas em diferentes tecnologias e, assim, muitas dúvidas têm surgido sobre o risco do seu impacto sobre a saúde humana (Oberdörster *et al.*, 2005; Shukla *et al.* 2005).

Recentes avanços e progressos em nanobiotecnologia demonstraram que as NPs podem ser utilizadas como veículos de transporte e cedência de fármacos, agentes terapêuticos, agentes de contraste e como marcadores biológicos luminescentes para imagiologia biomédica (Templeton *et al.*, 2000; Astruc, 2004; Boisselier e Astruc, 2009; Cuenca *et al.*, 2006; Aillon *et al.*, 2009; Medina *et al.*, 2007; Mukherjee *et al.*, 2007).

Actualmente, o conhecimento sobre a citotoxicidade induzida pelas NPs é ainda muito incompleto e o aparecimento de novas aplicações biomédicas com base nas NPs indica a necessidade de compreender, comparar e controlar sua citotoxicidade. As nanopartículas de ouro (AuNPs) são amplamente utilizadas em imagiologia biomédica e exames de diagnóstico. Em geral, as AuNPs são reconhecidas como sendo biocompatíveis com base na reconhecida estabilidade química do Au (0) (Lewinski *et al.*, 2008). Ainda assim, há alguns relatórios sobre a sua toxicidade, indicando o seu tamanho, química de superfície e forma como as possíveis causas dessa toxicidade (Bhattacharya e Mukherjee, 2008; Daniel e Astruc, 2004).

O fígado é considerado um órgão preferencial de acumulação AuNPs. A linha celular de hepatoma humano (Hep G2) é reconhecida como modelo realista e relevante do comportamento dos hepatócitos (O'Brien *et al.*, 2006; Noor *et al.*, 2009). Neste contexto, investigamos a citotoxicidade induzida por AuNPs esféricas de 20 nm, funcionalizadas com diferentes moléculas, incluindo (i) citrato, (ii) ácido 11-mercaptoundecanóico (MUA), (iii) pentapéptido CALND e (iv) pentapéptido CALNS. Para isso, culturas confluentes HepG2, foram incubadas, durante 6, 12, 24, 48, 72 e 96 horas, com diferentes concentrações de todos os tipos de AuNPs. A viabilidade celular foi avaliada por meio de ensaios de viabilidade celular: ensaio de redução mitocondrial do MTT e ensaio de libertação da LDH. Os resultados sugerem que as AuNPs não têm toxicidade significativa para este modelo celular. Os baixos níveis de citotoxicidade observados com este tipo de AuNPs foram relacionados com o agente de revestimento utilizado para estabilizar e conferir novas características físico-químicas de superfície às AuNPs, o que já tinha sido demonstrado noutros estudos (Lewinski *et al.*, 2008).

Também se investigou a influência de diferentes revestimentos sobre a capacidade de interiorização de AuNPs nas células HepG2. Com este propósito foram aplicadas e

desenvolvidas duas técnicas - uma técnica de avaliação qualitativa por microscopia de transmissão electrónica (TEM) e outra técnica de avaliação quantitativa por espectrometria de absorção atómica com atomização electrotérmica (EAA/AE). A internalização e localização subcelular dos diferentes tipos de AuNPs (100 µM, durante 24 horas) foram avaliadas por TEM. A técnica de EAA/AE foi desenvolvida e aplicada para a quantificação de Au coloidal, após a exposição das células a uma gama de concentrações de AuNPs de revestimentos diferentes. As células HepG2 foram incubadas durante 24 horas com as diferentes AuNPs (1-200 µM de Au) e foi quantificado o conteúdo intracelular de Au.

As microfotografias por TEM sugerem que a capacidade de internalização das AuNPs diferiu em função do tipo de revestimento, o mecanismo de internalização parece ser similar entre os diferentes tipos de AuNPs e parece ocorrer através da formação de endossomas, por um mecanismo de endocitose mediado por um receptor (REM) (Shukla *et al.*, 2005; Chithrani e Chan, 2007; Nativo *et al.*, 2008; Mukherjee *et al.*, 2007).

Interpretados em conjunto, os resultados obtidos sugerem que nas condições experimentais do trabalho aqui apresentado, as AuNPs esféricas, 20 nm, revestidas com modificadores de superfície diferentes (citrato, MUA, CALND e CALNS), não são tóxicas para as células HepG2, apesar de serem internalizadas nas células. Estes resultados estão de acordo com trabalhos realizados por outros grupos (Shukla *et al.*, 2005; Lewinski *et al.*, 2008; Connor *et al.*, 2005; Jafari *et al.*, 2010; Yang-Juan *et al.*, 2009; Kunzman *et al.*, 2010).

Os dados obtidos mostraram que todos os tipos de Au NPs testados foram internalizados na linha celular HepG2, mas de forma diferente, de acordo com o agente de revestimento utilizado. Foi observado que a internalização das partículas aumentou com o aumento das concentrações de AuNPs e que os valores mais elevados de internalização foram encontrados para AuNPs revestidas de CALND.

*Palavras-chave: nanopartículas de ouro (AuNPs), linha celular de hepatoma humano (HepG2), citotoxicidade, revestimentos, internalização, TEM, EAA/AE.*



## Abstract

During the last years engineered nanoparticles (NPs) have been extensively used in different technologies and consequently many questions have arisen about the risk and the impact on human health following exposure to NPs (Oberdörster *et al.*, 2005; Shukla, *et al.*, 2005). Recent advances and progress in nanobiotechnology have demonstrated many NPs as potential and novel drug delivery vehicles, therapeutic agents, contrast agents and luminescent biological labels for bioimaging (Templeton *et al.*, 2000; Astruc, 2004; Boisselier and Astruc, 2009; Cuenca *et al.*, 2006; Aillon *et al.*, 2009; Medina *et al.*, 2007; Mukherjee *et al.*, 2007).

At present, knowledge about the cytotoxicity induced by NPs is still largely incomplete and the emergence of new biomedical applications based on NPs signifies the need to understand, compare, and manage their cytotoxicity. Gold nanoparticles (AuNPs) are widely used in biomedical imaging and diagnostic tests. In general, AuNPs are recognized as being nontoxic based on the chemical stability of Au (0) (Lewinski *et al.*, 2008). Still, there have been some reports on their toxicity, which has been shown to depend on the physical dimension, surface chemistry, and shape of the NPs (Bhattacharya and Mukherjee, 2008; Daniel and Astruc, 2004).

The liver has been observed to be a preferential site of NPs accumulation after NPs exposure and the cell line human hepatoma (Hep G2) is thought to be a more realistic and relevant model of hepatocyte behaviour (O'Brien *et al.*, 2006; Noor *et al.*, 2009). In this context, we have investigated the cytotoxicity induced by 20 nm spheric AuNPs functionalized with different coatings such as (i) citrate, (ii) the 11-mercapto-undecanoic acid (11-MUA), (iii) CALND pentapeptide and (iv) CALNS pentapeptide. With this purpose, HepG2 confluent cultures were incubated for 6, 12, 24, 48, 72 and 96 hours with different concentrations of all types of AuNPs. The cell viability was evaluated using the mitochondrial MTT reduction and the LDH-release assays. The results suggest that the AuNPs do not have significant toxicity in this cellular model. Low levels of cytotoxicity observed with this type of NPs were related with the capping agent used to stabilize and to introduce useful functionalization at the NP surface, what is described in previous works (Lewinski *et al.*, 2008).

We have also investigated the influence of different coatings on the internalization capacity of the AuNPs in HepG2 cells. With this purpose two techniques were applied and developed – a qualitative evaluation technique of transmission electronic microscopy (TEM) and a quantitative evaluation with electrothermal atomization atomic absorption spectrometry (EAA/AE) method. Internalization and subcellular localization of the different

AuNPs (at 100  $\mu\text{M}$ , for 24h) were assessed by TEM. The EAA/AE was developed and applied to the quantification of colloidal gold after exposure of the cells to a range of AuNPs concentrations and different coatings. The HepG2 cells were incubated for 24h with the different AuNPs (1-200  $\mu\text{M}$  of Au) and the intracellular content of Au was quantified.

TEM analysis suggested that the internalization capacity of AuNPs differed according to the type of coating and the uptake mechanism appears to be similar and to occur through the formation of endosomes by an endocytic mechanism mediated by a receptor (REM) (Shukla *et al.*, 2005; Chithrani and Chan, 2007; Nativo *et al.*, 2008; Mukherjee *et al.*, 2007).

Taken together, the obtained results suggest that, under the present experimental conditions, spherical 20 nm AuNPs coated with different surface modifiers (citrate, MUA, CALND and CALNS) are not toxic to Hep G2 cells, despite being taken up by the cells. These results are in accordance with previous works (Shukla, *et al.*, 2005; Lewinski *et al.*, 2008; Connor *et al.*, 2005; Jafari *et al.*, 2010; Yang-Juan *et al.*, 2009; Kunzman *et al.*, 2010).

The obtained data showed that all types of Au NPs tested were internalized in HepG2 cell line but to a different extent according coating agent. It was observed that the internalization of the particles increased with increasing AuNPs concentrations. The higher rate of internalization was observed for CALND-coated AuNPs.

*Keywords: Gold nanoparticles (AuNPs), cell line human hepatoma (Hep G2), cytotoxicity, coatings, internalization capacity, TEM, EAA/AE.*

***ÍNDICES***



## **ÍNDICE GERAL**

<b>AGRADECIMENTOS</b>	v
<b>RESUMO</b>	vii
<b>ABSTRACT</b>	ix
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	xvii
<b>ÍNDICE DE TABELAS</b>	xxiii
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS</b>	xxv
<b>APRESENTAÇÃO E ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO</b>	1
1. Apresentação	3
2. Estrutura da Dissertação	5
<b>I – INTRODUÇÃO</b>	7
1. Importância e Aplicações da Nanobiotecnologia	9
2. Características Específicas das Nanopartículas	11
3. Aplicação do Ouro na Medicina: Perspectiva Histórica	14
4. Características das AuNPs e sua Aplicação na Medicina	16
5. Caracterização das NPs para Avaliação Toxicológica	24
6. Estudos de Citotoxicidade e de Internalização de AuNPs	26

<b>II – TRABALHO EXPERIMENTAL</b>	<b>55</b>
<b>1. Objectivos</b>	<b>57</b>
<b>2. Materiais Utilizados</b>	<b>58</b>
<b>1.1. Reagentes para cultura celular, ensaios de citotoxicidade e de internalização</b>	<b>58</b>
<b>1.2. Instrumentos para cultura celular, ensaios de citotoxicidade e de internalização</b>	<b>59</b>
<b>3. Linha Celular de Hepatoma Humano (HepG2)</b>	<b>60</b>
<b>4. Métodos de Síntese das AuNPs</b>	<b>63</b>
<b>5. Caracterização das AuNPs Revestidas com Citrato, MUA, CALND e CALNS</b>	<b>66</b>
<b>6. Determinação da Viabilidade Celular</b>	<b>74</b>
<b>7. Internalização dos Diferentes Tipos de AuNPs</b>	<b>77</b>
<b>7.1. Tratamento das células HepG2 para determinação qualitativa da internalização das AuNPs por TEM</b>	<b>78</b>
<b>7.2. Tratamento das células HepG2 para determinação quantitativa da internalização das AuNPs por EAA/AE</b>	<b>81</b>
<b>8. Análise Estatística</b>	<b>82</b>
<b>III – RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>83</b>
<b>1. Resultados Experimentais de Citotoxicidade</b>	<b>85</b>
<b>2. Resultados Experimentais de Internalização</b>	<b>93</b>

2.1.	Internalização dos diferentes tipos de AuNPs avaliada por TEM	94
2.2.	Internalização dos diferentes tipos de AuNPs avaliada por EAA/AE	104
<b>IV – CONCLUSÕES E PROJECTOS PARA O FUTURO</b>		<b>113</b>
1.	Conclusões	115
2.	Projectos para o Futuro	119
<b>V – BIBLIOGRAFIA</b>		<b>123</b>





## ÍNDICES DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Raios de dispersão da luz de nanoestruturas com diferentes tamanhos e formas.	13
<b>Figura 2</b> – Representação esquemática de AuNPS com formas e estruturas diferentes.	17
<b>Figura 3</b> – Esquema que ilustra as diversas funcionalizações de uma AuNP (ligandos de vectorização, para diagnóstico por imagiologia, entidades terapêuticas, entre outros).	19
<b>Figura 4</b> – Rearranjo e forma de dispersão típico de NPs com proteínas/DNA/péptidos como agentes de revestimento (esquerda). Representação esquematizada da ligação de um péptido à superfície da NP, por intermédio do grupo tiol, presente na cisteína (direita).	20
<b>Figura 5</b> – Libertação fototérmica de um fármaco a partir de uma microcápsula contendo AuNPs na sua cobertura (a); estimulação fototérmica da microcápsula e ruptura do seu revestimento (b); (c) libertação da molécula terapêutica.	22
<b>Figura 6</b> – Diagrama esquemático que representa uma AuNP com revestimento primário de um polímero de quitosano e a associação posterior de insulina.	23
<b>Figura 7</b> – Principais vias endocíticas.	36
<b>Figura 8</b> – Ilustração esquemática de AuNPs com diferentes cargas em células.	38
<b>Figura 9</b> – Internalização das AuNPs em função do seu tamanho.	39
<b>Figura 10</b> – Imagens TEM e quantificação das AuNPs nas células.	40
<b>Figura 11</b> – Cinética da entrada das AuNPs nas células HeLa.	41
<b>Figura 12</b> – O efeito da forma das AuNPs na internalização das mesmas.	42

<b>Figura 13</b> – Proteínas do meio de cultura celular ligam-se às AuNPs funcionalizadas, o que permite que a criação de uma interface entre as AuNPs e a membrana celular e a subsequente internalização das AuNPs nas células.	43
<b>Figura 14</b> – Avaliação do mecanismo de entrada das AuNPs esféricas e nanorods com diâmetros de 14, 60, 20x30, 14x60e 7x42 nm, revestidas de transferrina, nas células HeLa.	45
<b>Figura 15</b> – Diferentes estádios do processo de entrada de AuNPs revestidas de transferrina, 50 nm.	46
<b>Figura 16</b> – Diferentes estádios da internalização de AuNPs revestidas de transferrina, com diâmetro aproximado de 14 nm em células HeLa (A-D).	46
<b>Figura 17</b> – Diferentes estádios do processo de exocitose.	48
<b>Figura 18</b> – Esquema representativo da curva de crescimento padrão de células num sistema fechado.	62
<b>Figura 19</b> – Fotografias das células HepG2 que cresceram até à confluência num frasco T75 cm <sup>2</sup> .	63
<b>Figura 20</b> – Imagem de uma amostra da solução coloidal de AuNPs resultante da síntese pelo método de redução pelo citrato.	64
<b>Figura 21</b> – Esquema representativo da funcionalização de uma AuNP com moléculas com ligação – SH na sua extremidade.	65
<b>Figura 22</b> – Espectro de UV/Vis das AuNPs de citrato: Banda plasmónica bem definida, centrada a 520 nm, característica de AuNPs esféricas. As AuNPs apresentam monodispersão.	67
<b>Figura 23</b> – Imagem TEM das AuNPs de citrato. AuNPs esféricas, monodispersas.	68
<b>Figura 24</b> – Imagem DLS das AuNPs de citrato. Tamanho médio de, aproximadamente, 21 nm. Nota: a matéria que recobre as AuNPs não é detectada.	69

<b>Figura 25</b> – Representação esquemática do potencial zeta à superfície de uma partícula.	69
<b>Figura 26</b> – Imagem de Potencial Zeta das AuNPs de citrato. Valor medido: -41 mV.	70
<b>Figura 27</b> – Espectros de absorção de UV/Vis de AuNPs antes e após da funcionalização com MUA (a) CALND (b) e CALNS (c) às 0h, 6h e 24h.	71
<b>Figura 28</b> – Linha celular de hepatócitos humanos C3A (A e C) e hepatócitos primários de rato (B e D) tratados com NPs fluorescentes de poliestireno (a verde) de 20 nm de diâmetro (A e B) e 200 nm diâmetro (C e D), incubadas durante 1 hora, <i>in vitro</i> .	79
<b>Figura 29</b> – Avaliação da citotoxicidade das AuNPs nas células HepG2 pelo ensaio de redução do MTT após 6 horas de incubação.	86
<b>Figura 30</b> – Avaliação da citotoxicidade das AuNPs nas células HepG2 pelo ensaio de redução do MTT após 24 horas de incubação.	86
<b>Figura 31</b> – Avaliação da citotoxicidade das AuNPs nas células HepG2 pelo ensaio de redução do MTT após 48 horas de incubação.	87
<b>Figura 32</b> – Avaliação da citotoxicidade das AuNPs nas células HepG2 pelo ensaio de redução do MTT após 72 horas de incubação.	87
<b>Figura 33</b> – Avaliação da citotoxicidade das AuNPs nas células HepG2 pelo ensaio de redução do MTT após 96 horas de incubação.	88
<b>Figura 34</b> – Avaliação da citotoxicidade das AuNPs revestidas de citrato nas células HepG2 pelo ensaio de Liberação da LDH após 6,24,48,72 e 96 horas de incubação.	89
<b>Figura 35</b> – Avaliação da citotoxicidade das AuNPs revestidas de MUA nas células HepG2 pelo ensaio de Liberação da LDH após 6,24,48,72 e 96 horas de incubação.	90
<b>Figura 36</b> – Microfotografias TEM de células HepG2 não incubadas com AuNPs controlo.	94

<b>Figura 37</b> – Microfotografias TEM de células HepG2 incubadas, 24 horas, com uma solução de AuNPs de citrato na concentração de 1 $\mu$ M.	95
<b>Figura 38</b> – Microfotografias TEM de células HepG2 incubadas, 24 horas, com uma solução de AuNPs de citrato na concentração de 30 $\mu$ M.	95
<b>Figura 39</b> – Microfotografias TEM de células HepG2 incubadas, 24 horas, com uma solução de AuNPs de citrato na concentração de 100 $\mu$ M.	95
<b>Figura 40</b> – Microfotografias TEM de células HepG2 incubadas, 24 horas, com uma solução de AuNPs de citrato na concentração de 100 $\mu$ M.	98
<b>Figura 41</b> – Microfotografias TEM de células HepG2 incubadas, 24 horas, com uma solução de AuNPs de MUA na concentração de 100 $\mu$ M.	99
<b>Figura 42</b> – Microfotografias TEM de células HepG2 incubadas 24 horas, com uma solução de AuNPs de CALND na concentração de 100 $\mu$ M.	100
<b>Figura 43</b> – Microfotografias TEM de células HepG2 incubadas 24 horas, com uma solução de AuNPs de CALNS na concentração de 100 $\mu$ M.	101
<b>Figura 44</b> – Quantidade de Au coloidal internalizado em células HepG2 ( $\mu$ g de Au/mg de proteína), determinada por EAA/AE, após 24 horas de incubação de células HepG2, com soluções de diferentes concentrações de AuNPs citrato, AuNPs MUA, AuNPs CALND e AuNPs CALNS.	106
<b>Figura 45</b> – Quantidade de Au coloidal internalizado em células HepG2 ( $\mu$ g de Au/mg de proteína), determinada por EAA/AE, após 24 horas de incubação de células HepG2 com soluções de diferentes concentrações de AuNPs citrato, AuNPs MUA, AuNPs CALND e AuNPs CALNS.	107
<b>Figura 46</b> – Esquema dos quatros tipos de AuNPs, (AuNPs de citrato, MUA, CALND e CALNS), antes e depois de se colocarem em MEM- $\alpha$ com 10% de FBS).	110
<b>Figura 47</b> – Esquema de AuNPs esféricas com proteínas do FBS adsorvidas à sua superfície. Esquema de uma célula HepG2 com os diferentes receptores específicos na membrana, para proteínas do FBS e para os péptidos CALND e CALNS.	110

**Figura 48** – Fórmula de estrutura do péptido CALND indicando a posição dos respectivos aminoácidos. 111

**Figura 49** – Fórmula de estrutura do péptido CALNS indicando a posição dos respectivos aminoácidos. 111



## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Principais tipos de endocitose.	37
<b>Tabela 2</b> – Resumo dos resultados de toxicidade das AuNPs <i>in vitro</i> .	49
<b>Tabela 3</b> – Fórmulas químicas das estruturas dos agentes de funcionalização das AuNPs.	65
<b>Tabela 4</b> - Valores dos diâmetros médios das AuNPs com os diferentes agentes de revestimento utilizados na funcionalização.	72
<b>Tabela 5</b> - Valores de potencial $\zeta$ à superfície das AuNPs com os diferentes agentes de revestimento utilizados na funcionalização.	73





## ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

**A/Ala** – Alanina

**Abs** – absorvência

**AFM** – *Atomic Force Microscopy* (microscopia de força atômica)

**AgNP** – nanopartícula de prata

**Au** – símbolo químico do ouro

**AuNP – CALN (D, S)** – nanopartícula funcionalizada com cada um dos pentapéptidos

**AuNPs** – *Gold Nanoparticles* (nanopartículas de ouro)

**BSA** - *bovine serum albumin* (albumina de soro bovino)

**C/Cis** – Cisteína

**CALND** – pentapéptido (cisteína, alanina, leucina, asparagina e ácido aspártico)

**CALNS** – pentapéptido (cisteína, alanina, leucina, asparagina e serina)

**CPPs** - *cell penetrating peptides* (pequenos peptídeos policatiónicos ou anfifílicos com capacidade para penetrarem nas células, transportadores celulares de NPs nos sistemas vivos)

**CFLSM** – *Confocal-laser-scanning Microscopy* (Microscopia confocal com *Scanning a Laser*)

**CLL** – *B-Chronic Lymphocytic Leukemia* (leucemia linfocítica B-crónica)

**CTAB** – *cetyl trimethylammonium bromide* (brometo de cetiltrimetilamónio, surfactante catiónico)

**D/Asp** – Ácido Aspártico

**DLS** – *Dynamic Light Scattering* (Dispersão dinâmica de luz)

**DMEM** – *Dulbecco's Minimum Essential Media* (meio de cultura celular)

**DMSO** - dimetilsulfóxido

**DNA** – ADN, ácido desoxirribonucleico

**2D** – duas dimensões

**3D** – três dimensões

**EEA/AE** - *Electrothermal Atomization Atomic Absorption Spectrometry*  
(Espectrofotometria de Absorção Atômica por Atomização Electrotérmica)

**EDTA** - ácido etilenodioxitetraacético

**ELISA** - *enzyme-linked immunosorbant assay* (ensaio imunohistoquímico)

**FBS** - *fetal bovine serum* (soro bovino fetal)

**FCS** - *fetal calf serum* (soro fetal de bezerro)

**FCUP** – Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

**FFUP** – Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

**GSH** - glutatona reduzida

**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** – ácido sulfúrico

**HAuCl<sub>4</sub>** - ácido cloroáurico

**HBSS** - *Hanks Balanced Salt Solution* (solução salina)

**Hg** – mercúrio

**HIV** – síndrome de imunodeficiência adquirida

**HNO<sub>3</sub>** - ácido nítrico

**ICP/MS** - *Inductively coupled plasma mass spectrometry* (Espectrometria de massa com ionização induzida por plasma)

**ICP-AES** - *Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy* (Espectroscopia de emissão atômica com atomização por plasma)

**IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8** - *Interleukin 1-beta* (interleucina 1-beta)

**L/Leu** – Leucina

**LDH** – enzima lactato desidrogenase

**LPS** – lipopolissacarídeo

**MEM- $\alpha$**  - *Minimum Essential Medium Alpha* (meio de cultura celular)

**M<sub>R</sub>** – massa molecular relativa

**mRNA** – ácido ribonucleico mensageiro

**MTT** - 3- (4, 5-Dimethylthiazole-2-yl) -2, 5-diphenyltetrazolium bromide (brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio)

**11 - MUA** – ácido 11-mercaptoundecanóico

**N/Asn** – Asparagina

**NaN<sub>3</sub>** – azida sódica

**NIST** - *National Institute of Standards and Technology*

**NPs** – Nanopartículas

**P** - passagem das células

**PAA** – *poly (acrylic acid, sodium salt)* (poli- (ácido acrílico, sal sódico, polieletrólito aniónico)

**PAH** – *poly (allylamine hydrochloride)* (poli-cloridrato de alilamina, polieletrólito catiónico)

**PARP** - *poly-ADP-ribose polymerase*

**Pd** - paládio

**PDADMAC** – *poly (diallyldimethylammonium chloride)* (poli- cloreto de dialildimetilamónio, polieletrólito catiónico)

**PEG** – *poly (ethylene glycol)* (polietilenoglicol, revestimento inerte)

**PSS** – *poly (sodium 4- styrenesulfonate)* (poli- 4- estirenosulfonato de sódio, polieletrólito aniónico)

**RME** - *receptor-mediated endocytosis* (endocitose mediada por um receptor)

**RNS** – *Reactive Nitrogen Species* (espécies reactivas de azoto)

**ROS** – *Reactive Oxygen Species* (espécies reactivas de oxigénio)

**S/Ser** – Serina

**SAM** – *Self Assembled Monolayer* (camada auto-montada)

**SEM** - erro padrão da média

**SER** - *surface-enhanced Raman scattering*

**TBA** - ácido tiobarbitúrico

**TEM** – *Transmission electron Microscopy* (microscopia de transmissão electrónica)

**TNF- $\alpha$**  - *Tumor necrosis factor alpha* (factor de necrose tumoral alfa)

**TPPMS** – *triphenylphosphine monosulfonate* (monosulfonato trifenílfosfatado)

**UV/Vis** – Ultravioleta/visível

**VEGF** - *Vascular endothelial growth factor* (factor de crescimento vascular endotelial)

$\lambda$  – Comprimento de onda



***Apresentação***  
***Estrutura da Dissertação***



## APRESENTAÇÃO E ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

### 1. Apresentação

A nanotecnologia é uma área científica relativamente jovem, mas em rápida expansão. Esta área de investigação está focalizada no desenvolvimento de novas, sofisticadas e multifuncionais aplicações biomédicas, como o reconhecimento de células cancerosas, transporte de fármacos para tecidos-alvo e criação de dispositivos para monitorização terapêutica.

Assim, a nanotecnologia pode proporcionar a determinação, em tempo-real, do tratamento e eficácia cirúrgica, podendo mesmo ajudar a monitorizar mudanças intracelulares e prevenir o aparecimento de células pré-cancerosas.

Neste contexto, parafraseando Sinha e colaboradores, pode afirmar-se que, com dedicação e trabalho dos investigadores de várias áreas do conhecimento, se conseguem fazer “grandes coisas usando coisas muito pequenas” (Sinha *et al.*, 2006).

É então evidente que as aplicações da nanobiotecnologia começam a ter um impacto enorme na medicina convencional, permitindo a administração de medicamentos, de forma “inteligente”, precisa e localizada.

Sendo assim, esta área do conhecimento concebe o desenho de novos medicamentos de forma a serem facilmente transportados até locais-alvo, bem definidos, permitindo, deste modo, aumentar o sucesso terapêutico e a redução dos efeitos tóxicos.

No entanto, tendo em conta a diversidade dos nanomateriais produzidos pela engenharia das nanopartículas (NPs), é de extrema importância desenvolver mais trabalhos de investigação com o objectivo de caracterizar e avaliar os seus potenciais efeitos tóxicos, decorrentes da exposição humana durante o seu fabrico e utilização.

Não é fácil concretizar este objectivo, dado que os nanomateriais produzidos são únicos e complexos, tornando-se muito difícil a padronização de métodos analíticos para a sua caracterização e avaliação toxicológica. Cientes da complexidade deste processo, a caracterização e avaliação da toxicidade/biocompatibilidade das NPs serão melhor conseguidas através dos esforços de equipas multidisciplinares, envolvendo investigadores em toxicologia, ciências dos nanomateriais, medicina, biologia molecular, bioinformática e respectivas subespecialidades.

A completa avaliação das NPs para uso terapêutico englobam a caracterização minuciosa das suas propriedades físico-químicas, esterilidade, pirogenecidade, biodistribuição e determinação da sua toxicidade, tanto *in vitro* como *in vivo*.

No entanto, a metodologia para a caracterização e avaliação da toxicidade dos nanomateriais ainda se encontra em fase embrionária, mas é expectável que, num futuro próximo, se façam progressos e que a utilização da nanotecnologia seja segura e benéfica.

Neste contexto, a importância desta investigação prende-se com o facto de terem sido realizados ensaios comparativos de citotoxicidade e de internalização *in vitro* de nanopartículas de ouro (AuNPs) funcionalizadas com citrato (AuNP citrato), com ácido 11 - mercaptoundecanóico (AuNP MUA) e com os pentapéptidos CALND e CALNS (AuNP CALND, AuNP CALNS, respectivamente).

As AuNPs são NPs inorgânicas metálicas, exaustivamente estudadas, uma vez que a utilização do Au na medicina é já muito antiga. A aplicação biológica das AuNPs teve início em 1971 depois da descoberta da marcação imunológica por Au. Desde então, as AuNPs têm sido utilizadas num grande número de aplicações biológicas, principalmente como veículos de cedência de substâncias terapêuticamente activas, ou como sondas para visualização de vários compartimentos celulares utilizando a microscopia electrónica (Faulk e Taylor 1971). É importante referir que as AuNPs têm sido exploradas pelo *National Institute of Standards and Technology (NIST)*, como NPs de referência (“gold standard”), para laboratórios cujo trabalho se baseia no estudo das respostas biológicas às NPs (Fadeel e Garcia-Bennett 2009; [www.nist.gov](http://www.nist.gov)).

Neste contexto, as AuNPs apresentam promissoras aplicações na biomedicina dado que os resultados obtidos em estudos efectuados *in vitro* e *in vivo*, desenvolvidos por diversas equipas de investigadores, têm vindo a demonstrar a sua biocompatibilidade. Por outro lado, as AuNPs são relativamente fáceis de sintetizar, são relativamente estáveis e possuem uma grande área de superfície que permite a ligação de um grande número de moléculas, quer de fármacos quer de grupos funcionais. A ligação Au-tiol é a base da formação da camada organizada de moléculas na superfície do ouro (*SAM- self-assembled monolayer*), permitindo a funcionalização versátil destas NPs (Love *et al.*, 2005; Bhattacharya e Mukherjee, 2008; Daniel e Astruc, 2004; Mukherjee *et al.*, 2007).

Mas, devido ao facto do Au apresentar toxicidade para alguns órgãos como os rins, fígado e baço e tendo em conta que a absorção e a distribuição podem ser comprometidas pela seu reconhecimento pelo sistema imune, é necessário revestir as AuNPs com moléculas, nomeadamente com proteínas, processo designado por funcionalização. Estes revestimentos, também chamados ligandos, são úteis porque conferem às AuNPs carga positiva, negativa ou neutra, podendo, deste modo, facilitar a sua internalização num determinado tipo de células (Bhattacharya e Mukherjee, 2008). A funcionalização das AuNPs com diferentes revestimentos permite a sua estabilização,



diminui a formação de agregados, torna-as irreconhecíveis pelo sistema imune dos organismos, permitindo, ainda, a sua internalização porque alguns dos grupos funcionais (proteínas) têm receptores nas membranas celulares.

Face ao exposto, as AuNPs utilizadas no trabalho experimental deste estudo foram funcionalizadas com citrato, com MUA, com CALND e com CALNS. Com os ensaios experimentais realizados no âmbito desta dissertação pretendeu-se verificar, não só, se as AuNPs utilizadas, mas também os meios onde se encontram dispersas (veículos), são tóxicos para a linha celular de hepatoma HepG2. Pretendeu-se ainda avaliar se a internalização dos diferentes tipos de AuNPs está relacionada com os seus revestimentos.

## **2. Estrutura da Dissertação**

A estrutura desta dissertação engloba quatro capítulos. No capítulo I focam-se aspectos gerais da importância da nanotecnologia em diferentes áreas do conhecimento com especial destaque na biomedicina. Faz-se uma síntese das principais características das NPs que lhes conferem aplicações específicas em biomedicina e sublinha-se a necessidade de unir esforços de equipas multidisciplinares, no sentido de conseguir maximizar os benefícios decorrentes das investigações realizadas. Definem-se alguns conceitos básicos inerentes a esta área de investigação, abordam-se de forma sucinta as aplicações biomédicas de nanomateriais com maior destaque para as AuNPs, nomeadamente no que diz respeito à sua caracterização e aplicação. Faz-se também o enquadramento do tema desta dissertação em investigações já realizadas, que possam servir de referência à análise e discussão dos resultados apresentados neste trabalho.

No capítulo II foca-se o trabalho experimental realizado. São definidos os objectivos do estudo e referem-se os reagentes e instrumentos utilizados na realização dos ensaios experimentais. Descreve-se a linha celular HepG2 utilizada como modelo *in vitro*, apresentando-se algumas razões da sua escolha. Aborda-se o método de síntese dos diferentes tipos de AuNPs utilizadas neste estudo e faz-se a sua caracterização (forma, tamanho, carga superficial e dispersão). A funcionalização das AuNPs de citrato com diferentes compostos permitiu obter as AuNPs MUA, CALND e CALNS. Define-se o conceito de viabilidade celular e referem-se os testes destinados a avaliar a citotoxicidade dos diferentes tipos de AuNPs. Os ensaios experimentais relativos à internalização das AuNPs, determinada em função do Au encontrado dentro das células HepG2, foram também descritos neste capítulo.

A apresentação dos resultados e a sua discussão são objecto do capítulo III. As conclusões são apresentadas no capítulo IV, no qual também se faz referência a possíveis investigações futuras. Por fim apresentam-se as referências bibliográficas.

## ***I - INTRODUÇÃO***



# I – INTRODUÇÃO

## 1. Importância e Aplicações da Nanobiotecnologia

A nanobiotecnologia estuda as interações de componentes celulares e moleculares com nanomateriais, normalmente agregados de átomos, moléculas e fragmentos moleculares, em partículas muito pequenas entre 1 e 100 nm (Moghimi *et al.*, 2005; Sinha *et al.*, 2006; Medina *et al.*, 2007; British Standards Institution, 2007; Stone *et al.*, 2009).

Para compreender melhor a possibilidade de estabelecer estas interações entre nanopartículas (NPs), de dimensões extraordinariamente pequenas, com ultraestruturas celulares e biomoléculas, basta pensar que um nanómetro ( $10^{-9}$  m) é aproximadamente quatro vezes o diâmetro de um átomo individual, o diâmetro da dupla hélice do DNA é aproximadamente 2,5 nm e as moléculas proteicas têm tamanhos que podem rondar os 1-20 nm.

Se atendermos ao tamanho das ultraestruturas celulares, cujas dimensões se situam na escala nanométrica, não será difícil compreender a utilidade da aplicação da nanobiotecnologia na área da nanomedicina.

A nanomedicina é a ciência que, aliada à nanobiotecnologia, pretende contribuir para a prevenção, diagnóstico e tratamento de doenças, com a finalidade de melhorar a saúde humana (Liang *et al.*, 2008; Devalapally *et al.*, 2006).

O *National Institutes of Health* (EUA) fez a revisão da utilização da nanotecnologia na medicina, introduzindo o termo de nanomedicina para descrever essas aplicações (Medina *et al.*, 2007).

A nanotecnologia permite o fabrico de uma grande série de NPs com propriedades físico-químicas específicas (ópticas, eléctricas e magnéticas) e possibilita ainda a sua funcionalização, adicionando-lhes outras moléculas, que distribuídas na sua superfície envolvente, permitem que se liguem e se combinem com moléculas e estruturas biológicas. Estas aplicações das NPs são muito úteis no diagnóstico molecular (nanodiagnóstico) e no impulsionamento da descoberta, concepção e transporte de fármacos (nanofarmacêutica).

O desenvolvimento da nanobiotecnologia tem contribuído muito para o progresso científico na área das terapias biológicas, como a vacinação, terapia celular e terapia genética.

Esta nova e emergente ciência, também se aplica no desenvolvimento de inúmeros dispositivos, como os nanorobots, muito benéficos pela inovação que trazem ao nível da cirurgia (Chan, 2006).

Todos os campos da medicina e da cirurgia podem tirar partido destas aplicações da nanobiotecnologia, como por exemplo a oncologia, neurologia, cardiologia, ortopedia, oftalmologia, bem como a imunologia.

Pode dizer-se que as nanotecnologias abriram as portas do mundo a dimensões nanométricas, permitindo, assim, um progresso notável na medicina e na cirurgia, dado que os processos biológicos e patológicos das células ocorrem no âmbito dessa mesma escala.

A nanomedicina pode também ser considerada um refinamento da medicina molecular, permitido avanços na área da genómica e proteómica e conduzindo ao desenvolvimento da “medicina personalizada”.

O crescimento exponencial que as nanociências têm tido nos últimos anos, mobilizou a atenção do público, entidades reguladoras e de toda a comunidade científica, para a necessidade de avaliar os riscos que os nanomateriais podem representar, tanto para o homem como para o ambiente, dado que a sua produção, quer à escala laboratorial quer à escala industrial, é cada vez maior.

Nesta perspectiva, em 2004, Donaldson e colaboradores propuseram um novo conceito na área da Toxicologia – a ideia de que as NPs se comportam de maneira diferente dos materiais da mesma composição química mas de maiores dimensões, sugerindo a criação de uma nova área, a Nanotoxicologia (Donaldson *et al.*, 2004; no livro *Nanotoxicology, Characterization, Dosing and Health Effects*”, 2007).

Esta ideia foi bem acolhida por Oberdörster e seus colaboradores, cujo trabalho no âmbito da nanotoxicologia, levou à publicação de uma revisão da literatura existente: “Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles” (Monteiro-Riviere e Lang Tran, “Nanotoxicology, Characterization, Dosing and Health Effects”, 2007).

Nos últimos anos, muitas equipas de investigadores em todo o mundo e de diversas áreas científicas têm trabalhado no sentido de desenvolver novas aplicações biomédicas de nanomateriais. Esse grande esforço está patente nas inúmeras publicações que todos os anos surgem e no grande número de conferências e congressos realizados com o objectivo de debater este tema.

Não se podem ignorar os diferentes cenários possíveis de ocorrência de toxicidade, desde a exposição durante a manufactura, exposição nos laboratórios de investigação,

exposição ambiental, aos produtos resultantes da manufactura e aos produtos que se formam depois da sua utilização, como produtos de consumo e medicinais.

Para desenvolver ensaios que permitam testar a toxicidade das NPs é imperativo uniformizar metodologias, caracterizar devidamente as NPs do ponto de vista físico-químico e avaliar quais destas características são mais determinantes para a sua toxicidade. É também imprescindível desenhar testes novos ou adaptar os testes já existentes, no sentido de minimizar os erros cometidos na avaliação da toxicidade dos nanomateriais (Royal Society and Royal Academy of Engineering, 2004; Monteiro-Riviere e Lang Tran, “Nanotoxicology, Characterization, Dosing and Health Effects”, 2007; Marquis *et al.*, 2009).

## **2. Características Específicas das Nanopartículas**

A nanotecnologia depende, em parte, da exploração das propriedades específicas que os nanomateriais apresentam, pelo facto de serem sintetizados à nanoescala. Estas propriedades físico-químicas únicas das NPs são também as que lhes conferem uma actividade biológica peculiar que, de certo modo, depende do seu tamanho. Essa diferente actividade biológica das NPs prende-se com aspectos inerentes à sua capacidade de transpor as barreiras fisiológicas, à sua enorme reactividade química relacionada com a grande área superficial que apresentam em relação ao seu diminuto tamanho (Monteiro-Riviere e Lang Tran, “Nanotoxicology, Characterization, Dosing and Health Effects”, 2007).

Este comportamento único das NPs requer novas ferramentas e conceitos na área da toxicologia, para que se consiga compreender e, de alguma forma, prever os efeitos decorrentes da interacção das NPs sintetizadas pelo homem, com o seu organismo e com o ambiente (Monteiro-Riviere e Lang Tran, “Nanotoxicology, Characterization, Dosing and Health Effects”, 2007).

Oberdörster e colaboradores deram os primeiros passos direccionados para a concepção de uma estratégia de avaliação toxicológica dos nanomateriais que vão surgindo. Estes investigadores identificaram 17 características das NPs que devem ser consideradas quando se pretende avaliar a sua toxicidade, tais como o seu tamanho, forma, área superficial, revestimentos, estrutura cristalina, entre outras. Contudo, as técnicas de avaliação das características físico-químicas das NPs não podem ser determinadas por técnicas utilizadas para a caracterização dos materiais de maior

tamanho, nem com as técnicas de rotina aplicadas nos laboratórios (Oberdörster *et al.*, 2005).

A caracterização física e química das NPs representa um passo importante nos estudos toxicológicos e ecotoxicológicos, no sentido de avaliar correctamente os seus efeitos tóxicos, identificar as suas possíveis vias de exposição e prever os riscos relacionados com a sua síntese e utilização (Monteiro-Riviere e Lang Tran, “Nanotoxicology, Characterization, Dosing and Health Effects”, 2007).

Idealmente todos os ensaios toxicológicos deveriam ser acompanhados de uma caracterização detalhada das propriedades físico-químicas das NPs testadas, com implicações relevantes a nível biológico.

Sabe-se que as dimensões de um material sólido têm influência nas suas propriedades físicas e químicas. Então, quando as dimensões dos materiais diminuem para escalas nanométricas, as suas propriedades físico-químicas podem tornar-se muito diferentes das propriedades dos mesmos materiais com maiores dimensões.

Sendo assim, pode dizer-se que as propriedades dos nanomateriais de uma determinada substância, que dependem apenas do seu tamanho, determinam que eles se comportem como se de uma nova substância se tratasse (Borm *et al.*, 2006).

A relação entre o volume das NPs sólidas e a sua área superficial confere-lhes propriedades específicas, tornando-as muito activas nas reacções químicas pela grande superfície de exposição aos respectivos reagentes. Esta capacidade reactiva é tanto maior quanto menor for o volume das NPs, uma vez que o número de átomos ou moléculas da sua área envolvente aumenta exponencialmente com a diminuição do tamanho das partículas.

O aumento da actividade biológica pode ser positiva e desejável, como são exemplo a actividade antioxidante, capacidade de transporte de agentes terapêuticos e penetração nas barreiras celulares, mas o aumento da actividade biológica também pode ter efeitos negativos e indesejáveis, induzindo toxicidade, *stress* oxidativo e disfunção celular, podendo ainda abarcar efeitos das duas naturezas, isto é, positivos e negativos.

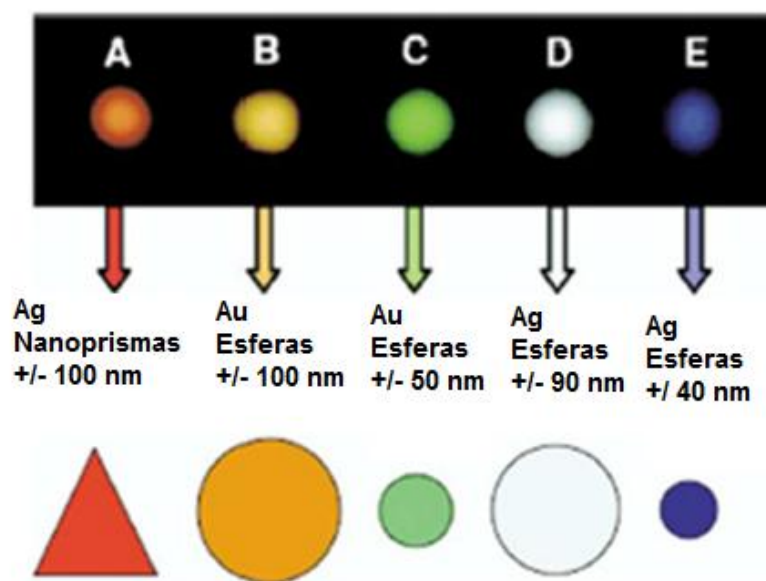
Esta importantíssima característica das NPs, grande área superficial *versus* volume, também permite a sua fácil interacção com as células e as suas estruturas celulares, desenvolvendo uma biocinética diferente relativamente à das partículas de maior tamanho.

Outra característica muito importante das NPs é adquirirem novas propriedades ópticas, electrónicas e estruturais, que não estão presentes em moléculas individuais ou em sólidos de maior tamanho (*bulk solids*) (Sinha *et al.*, 2006).



As NPs têm uma gama de aplicações vastíssima decorrente das suas propriedades específicas, que se tornam ainda mais especiais pela possibilidade de proceder a modificações, alterando o seu tamanho, forma, composição e revestimento, adequando-as a determinados fins, consoante o interesse dos cientistas.

A Figura 1 esquematiza, de forma simples, a possibilidade de alteração das propriedades específicas, neste caso propriedades ópticas, de nanoestruturas metálicas, modificando, apenas, as suas dimensões e formas (Chan, 2006; Warheit *et al.*, 2008).



**Figura 1** – Raios de dispersão da luz de nanoestruturas com diferentes tamanhos e formas (adaptada de Chan, 2006).

As mudanças nas propriedades ópticas e de transporte das NPs tornam-se muito evidentes para as que apresentam tamanhos inferiores a 30 nm.

Se a superfície química é influenciada pelo tamanho da partícula, as propriedades da sua superfície podem ainda ser alteradas, revestindo as NPs com diferentes materiais.

Esta interação da área superficial com a composição da partícula, no desencadeamento de respostas biológicas, acrescenta uma outra dimensão à já complexa avaliação das NPs, tanto na vertente dos potenciais benefícios como na vertente dos potenciais efeitos adversos, decorrentes da exposição a este tipo de materiais (Poma e Di Giorgio, 2008).

As propriedades das NPs influenciam a sua farmacocinética e a sua farmacodinâmica, tanto *in vitro* como *in vivo*, aspectos que podem ser explorados para aplicação médica (Holsapple *et al.*, 2005).

As características das NPs relacionadas com o seu comportamento biocinético são propriedades excelentes para promissoras aplicações na medicina, quer como meios de

diagnóstico e dispositivos terapêuticos, quer como ferramentas de investigação e compreensão dos processos moleculares e estruturas celulares vivas (Murthy, 2007).

### 3. Aplicação do Ouro na Medicina: Perspectiva Histórica

A utilização do Au na medicina tem uma tradição muito longa (Higby, 1982), podendo afirmar-se que o Au era já utilizado pelos Chineses em práticas médicas em 2500 a.C. Pensa-se que a extracção de Au teve início no quinto milénio a.C. perto de Varna (Bulgária) e é possível que os sais de Au tenham aparecido no quarto ou quinto século a.C. no Egipto e China (Daniel e Astruc, 2004).

Na Idade Média, atribuía-se aos sais de Au propriedades curativas de diversas enfermidades, como as doenças cardíacas, doenças venéreas, disenteria, epilepsia e tumores. Era também aplicado no diagnóstico (reações de precipitação) e tratamento da sífilis, aplicação essa que permaneceu em uso até ao século XX. Actualmente não se utiliza esse diagnóstico porque não é fidedigno (Kahn, 1928; Daniel e Astruc, 2004).

Na Índia, o Au coloidal vermelho continua a ser utilizado pela medicina ayurvédica, medicina tradicional alternativa desenvolvida há mais de sete mil anos. O nome dado pela Ayurveda (“Ayus” significa vida e “veda” conhecimento) aos medicamentos ayurvédicos é *Bhasma*. Estes medicamentos são obtidos através da incineração e purificação de metais, minerais e gemas (pedras preciosas e semi-preciosas). Estes compostos especiais são considerados mais potentes do que muitas ervas, possuindo um elevado poder de penetração no organismo humano (Higby, 1982; Mahdihassan, 1971; Mahdihassan, 1981).

Actualmente, em muitos países, ainda se fabricam medicamentos ayurvédicos com Au na sua composição. Esta medicina considera o Au o metal do coração e do sistema nervoso, sendo prescrito como tónico do sistema nervoso, do sistema imunológico e do sistema circulatório, indicado para doenças auto-imunes e para portadores de HIV (Mahdihassan, 1971; Mahdihassan, 1981). Este metal nobre sempre esteve conotado com propriedades revigorantes e rejuvenescedoras, tanto na China como na Índia. No mundo ocidental, o Au também tem sido utilizado na medicina, ao longo dos tempos, como tónico revitalizante, para distúrbios do sistema nervoso (Bhattacharya e Mukherjee, 2008).

A descoberta do efeito bacteriostático do cianeto de Au no bacilo de Koch, responsável pela tuberculose, atribuída a Robert Koch, marcou o começo da moderna utilização do Au com fins médicos. A aplicação do Au na terapia para a tuberculose foi

introduzida em 1920 (Bhattacharya e Mukherjee, 2008; Daniel e Astruc, 2004; Mahdihassan, 1971; Higby, 1982). Os compostos de Au são também utilizados no tratamento das doenças reumáticas, psoríase, artrite juvenil, reumatismo palindrômico e lúpus discóide eritematoso (Bhattacharya e Mukherjee, 2008; Fadeel e Garcia-Bennett, 2009; Chen *et al.*, 2008; Felson *et al.*, 1990; Shaw, 1999). Os tiolatos de Au, nomeadamente o aurotiomalato de sódio e a aurotioglucose sódica, foram os primeiros compostos utilizados no tratamento da artrite reumatóide. Eram administrados por injeção intramuscular profunda, uma vez que estes compostos são solúveis em água. Após a sua administração, estes compostos eram rapidamente biodistribuídos, sendo o Au rapidamente retirado da circulação sanguínea e distribuído por vários órgãos alvo: rins, fígado e baço. Nos rins, o Au apresenta nefrotoxicidade, sendo este o seu efeito adverso mais evidente. Outras reacções tóxicas incluem úlceras, reacções cutâneas, alterações sanguíneas e hepatotoxicidade (Bhattacharya e Mukherjee, 2008; Fadeel e Garcia-Bennett, 2009).

Foi a descoberta da actividade anti-tumoral da cisplatina, em 1969, que promoveu a investigação de outros metais com o mesmo fim e, assim, foi identificada a actividade anti-tumoral do Au (Haiduc e Silvestru, 1989). Em 1985 foi introduzido no mercado um novo composto de Au, o Auranofim®, para tratamento de problemas de artrite. O Auranofim®, representa a segunda geração de compostos de Au, desenhados numa tentativa de ultrapassar os problemas de farmacocinética e toxicidade dos primeiros compostos. Com efeito, o Auranofim®, é um composto mais lipofílico, o que lhe permite permanecer na circulação sanguínea por mais tempo. Outra vantagem deste fármaco é a sua menor nefrotoxicidade, uma vez que atinge o rim em quantidades menores (Berners-Price *et al.*, 1990; Berners-Price e Sadler, 1987; Bhattacharya e Mukherjee, 2008). O Tauredon® é também um fármaco contendo Au, usado como agente anti-inflamatório para o tratamento da artrite reumatóide (Alkilany e Murphy, 2010).

A continuação dos trabalhos de investigação com o Auranofim® veio demonstrar que este possui actividade citotóxica nas células epiteliais cancerígenas do cérvix (células HeLa) *in vitro* e nas células leucémicas P388 *in vivo*. O reconhecimento da actividade antitumoral do Auranofim®, conduziu à investigação de outros compostos de Au, como os complexos bis (difosfo) -Au (I), quimicamente semelhantes ao Auranofim®. Apesar das suas interessantes actividades anti-tumorais, estes complexos de Au não tiveram sucesso na terapêutica, devido à sua toxicidade cardiovascular (Berners-Price e Sadler, 1987; Bhattacharya e Mukherjee, 2008).

Recentemente, Bhattacharya e Mukherjee, 2008, descobriram as propriedades anti-angiogénicas das AuNPs, o que abre perspectivas muito promissoras da utilização das mesmas nas terapias anticancerígenas (Bhattacharya e Mukherjee, 2008).

Os mecanismos de acção dos fármacos com Au na sua composição, ainda não são bem compreendidos. Actualmente acredita-se que é o Au (0) que possui actividade, e que os compostos de Au que possuem as espécies Au (I) e Au (III) são reduzidas a Au (0) em determinadas condições biológicas. Em relação à acção do Au nas doenças reumáticas, pensa-se que está relacionada com a sua interacção com os grupos tióis das proteínas e as membranas celulares (Bhattacharya e Mukherjee, 2008; Fadeel e Garcia-Bennett, 2009).

Nas últimas décadas também foi relatada a actividade antimicrobiana, antimalárica e anti-HIV de diversos complexos de Au orgânicos (Shaw, 1999; Gielen e Tiekink, 2005; Sun *et al.*, 2007).

Importa, também, referir que micropartículas de radioisótopos de Au coloidal, demonstraram uma diversa aplicação no tratamento de diferentes tipos de cancro a nível local, em alguns casos com algumas vantagens em relação à radioterapia convencional. A vantagem deste tipo de radioterapia consiste em maximizar as doses da radiação que incidem no tumor alvo, sem danificar os tecidos normais circundantes (Andrews *et al.*, 1953; Bhattacharya e Mukherjee, 2008; Alkilany e Murphy, 2010; Ashamalla *et al.*, 2002). Recentemente o Au radioactivo tem sido utilizado em braquiterapia, recente técnica de radioterapia, no tratamento de vários tipos de cancro. A braquiterapia é uma forma de tratamento por radiação na qual a fonte radioactiva está colocada directamente dentro do tumor (Butler *et al.*, 1997; Bhattacharya e Mukherjee, 2008).

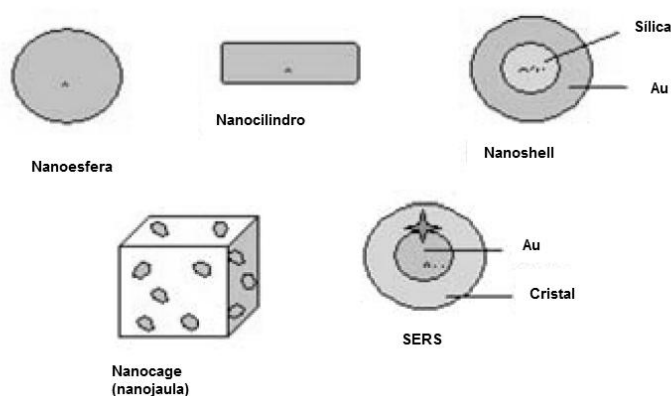
Outras aplicações médicas do Au incluem a sua utilização em dispositivos médicos como os “stents” (prótese expansível colocada internamente para prevenir ou impedir a constricção do fluxo sanguíneo) e dispositivos de regulação do ritmo cardíaco, assim como em implantes de ouvido e em odontologia (Bhattacharya e Mukherjee, 2008; Chen *et al.*, 2008).

#### **4. Características das AuNPs e sua Aplicação na Medicina**

As AuNPs encontraram bastante aceitação devido à sua estabilidade, baixa toxicidade, tamanho controlável pela síntese e relativa facilidade de modificação superficial com grupos amina e tiol. Todas estas propriedades, aliadas à sua capacidade de conjugação com DNA e proteínas, permitem obter nanossistemas para distintas

aplicações terapêuticas (Astruc, 2004; Boisselier e Astruc, 2009; Cuenca *et al.*, 2006; Aillon *et al.*, 2009).

Acredita-se que as AuNPs possam ser, no futuro, utilizadas como nanomateriais de referência e que possam ser consideradas nanopartículas-chave, funcionando como modelo de síntese de outras NPs, devido à sua grande estabilidade (Daniel e Astruc, 2004). Para obter AuNPs pode recorrer-se a várias técnicas de síntese, descritas em várias publicações, onde são referidos diferentes tipos de síntese e de NPs, caracterizadas quer pelos seus tamanhos e formas quer pela especificidade das propriedades físico-químicas que possuem. Na Figura 2, representam-se esquematicamente alguns exemplos de AuNPs cuja designação está relacionada com a respectiva forma (nanoesfera, nanocilindro, *nanoshell* (nanoconcha), *nanocage* (nanojaula) e SER (*Surface-Enhanced Raman Scattering*) (Boisselier e Astruc, 2009; Al-Qadi e Remuñán-López, 2009).



**Figura 2** – Representação esquemática de AuNPS com formas e estruturas diferentes (adaptado de Al-Qadi e Remuñán-López, 2009).

Uma das técnicas mais comuns para sintetizar AuNPs esféricas de Au com tamanhos entre 2-100 nm, baseia-se na redução controlada do ácido cloroáurico ( $\text{HAuCl}_4$ ), recorrendo a diferentes agentes redutores, em condições de síntese também distintas. É interessante referir que as primeiras soluções de Au coloidal foram preparadas por Faraday, em 1857, por redução do  $\text{HAuCl}_4$  com fósforo. Obteve uma solução de cor vermelha rubi, característica das reduzidas dimensões das partículas de Au dispersas na solução. No entanto, a confirmação da relação da cor rubi do Au coloidal com o tamanho das partículas de Au dispersas na solução, só ocorreu alguns anos depois. Mais tarde verificou-se que as cores das soluções de Au coloidal eram dependentes do tamanho e forma das partículas dispersas. Desde então, outras técnicas de síntese foram utilizadas para obter diversas AuNPs, utilizando, geralmente, o citrato como agente redutor. Para

impedir a aglomeração das AuNPs, a redução de sais de Au faz-se na presença de agentes estabilizadores, tais como o citrato, poli (N-vinil-2-pirrolidona), polímeros, CTAB, obtendo-se, desta forma, soluções de AuNPs monodispersas e de tamanho controlado (Turkevich *et al.*, 1951; Frens, 1973; Schmid, 1992; Brust *et al.*, 1994; Grabar *et al.*, 1995). Para sintetizar AuNPs com outras formas, utilizam-se outras técnicas.

Estas AuNPs, tanto as de forma esférica como os *rods*, possuem propriedades altamente favoráveis tanto a nível óptico como químico para a sua aplicação em técnicas de imagiologia e aplicações terapêuticas (Medina *et al.*, 2007).

As suas propriedades (ópticas, catalíticas, electromagnéticas, fototérmicas) são extremamente influenciadas pela sua forma, tamanho e propriedades superficiais (Bhattacharya e Mukherjee, 2008; Daniel e Astruc, 2004; Mulvaney, 1996; Burda *et al.*, 2005). Um exemplo que ilustra esta afirmação é o facto de as AuNPs terem uma cor vermelha rubi enquanto o Au metálico é amarelo. Deste modo, diferentes NPs podem ser sintetizadas com um determinado objectivo controlando a sua forma e tamanho (Bhattacharya e Mukherjee, 2008).

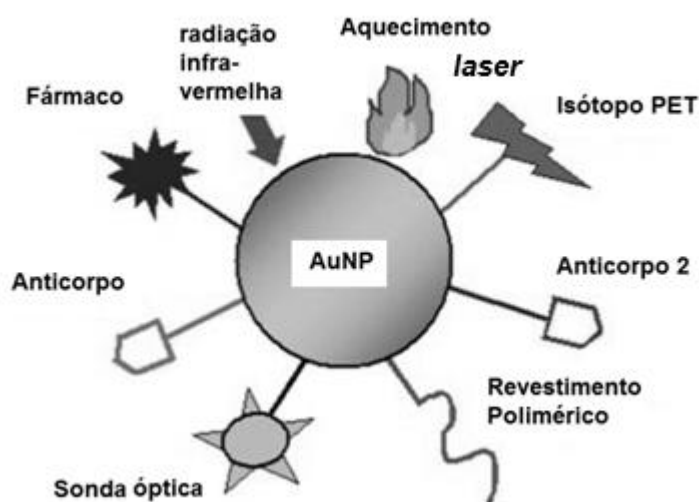
A singularidade das propriedades ópticas e fototérmicas das AuNPs atribuem-se às oscilações de ressonância dos seus electrões livres na presença da luz (“ressonância localizada de superfície plasmónica”), através da qual as AuNPs podem emitir luz, ou absorvê-la transformando-se rapidamente em calor. Neste contexto, detectou-se a emissão de calor intenso pelas AuNPs quando estimuladas com raios laser de determinada frequência, ou com outra fonte de calor (microondas, radiofrequência, ultrasons). Sendo assim, um grupo de pequenas AuNPs pode aquecer localmente uma área mil vezes superior ao seu tamanho, comportando-se como autênticos “aquecedores nanoscópicos activados pela luz” (Al-Qadi e Remuñán-López, 2009).

A capacidade fototérmica das AuNPs pode ser utilizada no tratamento fototérmico (hipertérmico), com selecção cirúrgica por *laser* das células tumorais, libertação de moléculas activas em locais específicos do organismo, na destruição de vírus e bactérias e na desnaturação de proteínas e ácidos nucleicos (Jain *et al.*, 2008; Zharov *et al.*, 2006).

As AuNPs apresentam, em comum com as outras NPs, uma elevada área superficial, podendo, deste modo, ser facilmente funcionalizadas e bioconjugadas, ocorrendo uma modificação útil das suas propriedades físico-químicas superficiais (Figura 3). A introdução de alterações na superfície de AuNPs, sintetizadas por um determinado método, utilizando agentes de revestimento específicos, é um procedimento frequente para a modificação das suas propriedades, podendo ser efectuada com o objectivo da:

- Estabilização de AuNPs muito reactivas;

- Estabilização de AuNPs com tendência a agregar num determinado meio (solvente) onde as NPs estão dispersas;
- Alteração da superfície de AuNPs com moléculas bifuncionais, dado que uma extremidade promove a ligação à superfície da NP e outra extremidade faz o reconhecimento molecular, permitindo a ligação a moléculas específicas;
- Promover o revestimento da AuNP com uma monocamada de ligandos (SAM), com elevada estabilidade termodinâmica (Soares, 2009; Nagarajan, 2008).



**Figura 3** – Esquema que ilustra as diversas funcionalizações de uma AuNP (ligandos de vectorização, para diagnóstico por imagiologia, entidades terapêuticas, entre outros) (adaptado de Al-Qadi e Remuñán-López, 2009).

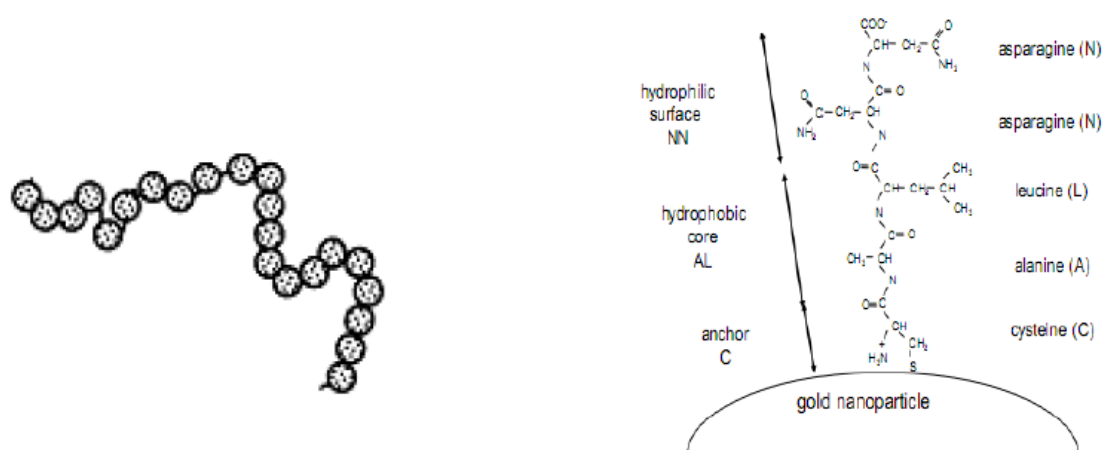
A afinidade de grupos funcionais tais como tióis (-SH), nitrilos (-CN) e aminas (-NH<sub>2</sub>) por NPs/superfícies metálicas tem sido bastante útil no âmbito da funcionalização das mesmas (Templeton *et al.*, 2000; Shimmin *et al.*, 2004).

As ligações formadas com estes grupos funcionais apresentam um carácter covalente e são, por isso, mais estáveis, em comparação com as interações electrostáticas que se verificam com a maioria dos agentes de revestimento. Neste contexto, o tipo de ligação do agente de revestimento à superfície da NP, deixa de ser física (adsorção do agente de revestimento por interações de *Van der Waals* à NP/superfície metálica) para ser uma ligação química (quimissorção) na qual há uma certa partilha dos electrões da camada de valência do elemento em questão (Templeton *et al.*, 2000; Soares, 2009).

A funcionalização de NPs é mais eficaz com grupos tiol, relativamente aos restantes grupos funcionais acima mencionados, visto que a interacção molecular entre o metal Au e os grupos que contenham enxofre é bastante elevada e tem sido amplamente utilizada em diversas aplicações (Templeton *et al.*, 2000; Soares, 2009).

Para conferir às NPs propriedades químicas superficiais similares às proteínas, podem utilizar-se péptidos que formam uma camada em redor das NPs (*Self Assembled Monolayer* – SAM) podendo ser utilizados, como sondas, para o reconhecimento específico de componentes intracelulares. Estes ligandos podem ser conjugados directamente com as AuNPs ou mediante pontes estabelecidas com PEG-tiolado (Sun *et al.*, 2008).

Na Figura 4 está esquematizado um exemplo do aspecto que as NPs podem adquirir quando revestidas com biomoléculas, sejam elas proteínas, ADN ou péptidos. Estes formam uma espécie de cadeia de NPs, devido às interacções dos diversos grupos funcionais presentes na estrutura das biomoléculas, acabando por se ligar entre si (Soares, 2009).



**Figura 4** – Rearranjo e forma de dispersão típico de NPs com proteínas/DNA/péptidos como agentes de revestimento (esquerda). Representação esquematizada da ligação de um péptido à superfície da NP, por intermédio do grupo tiol, presente na cisteína (direita) (adaptado de Soares, 2009).

A escolha dos péptidos para a funcionalização de NPs deve obedecer a determinados requisitos, nomeadamente a presença da cisteína que faz o elo de ligação entre a sequência peptídica e a NP, devido à existência de um grupo tiol na sua cadeia lateral e à capacidade que o péptido deve demonstrar em se auto-organizar numa densa camada que exclua a água, e um aminoácido terminal hidrofílico que assegure a solubilidade e



estabilidade do sistema (NP-péptido) em água, como sugere o esquema da Figura 4 (Soares, 2009).

As proteínas, em virtude de possuírem resíduos de cisteína e lisina, representam um bom ligando para NPs metálicas como as de Au, alterando as suas actividades biológicas. A equipa constituída por Bhattacharya e Mukherjee descobriu, recentemente, as propriedades anti-angiogénicas das AuNPs e a sua promissora aplicação no tratamento de vários tipos de cancro (Bhattacharya e Mukherjee, 2008).

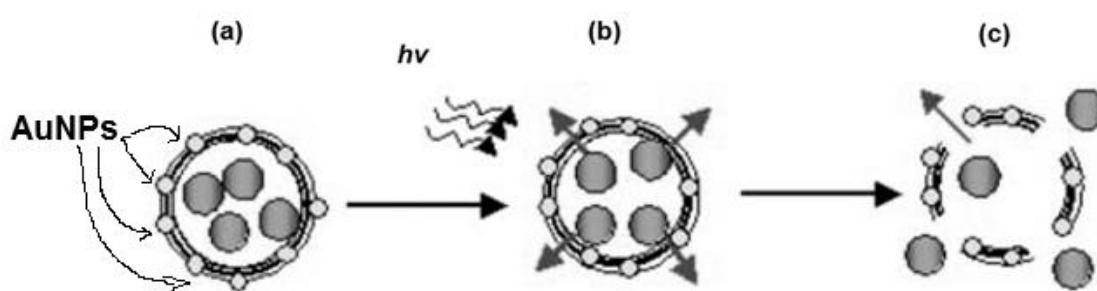
Este é o primeiro exemplo de um composto inorgânico que tem propriedades anti-angiogénicas, servindo como ponto de partida para a procura de outras nanopartículas inorgânicas que também possuam esta característica (Bhattacharya e Mukherjee, 2008).

Como muitas doenças como o cancro, artrite, degeneração macular, entre outras, são dependentes da angiogénese, estas descobertas abrem a possibilidade de inactivar a proteína que é responsável pela estimulação da angiogénese pelas NPs metálicas, como as AuNPs sem revestimentos, ou funcionalizadas. No futuro, será possível desenhar e sintetizar AuNPs que inactivem, de modo específico, uma determinada proteína de modo eficaz (Bhattacharya e Mukherjee, 2008).

Um exemplo que ilustra a possibilidade da aplicação das AuNPs no tratamento do cancro é o trabalho desenvolvido por Mukherjee e colaboradores, publicado em 2007. A leucemia linfocítica B-crónica (*CLL – B-Chronic Lymphocytic Leukemia*) é uma doença incurável caracterizada predominantemente pela resistência à apoptose. A via de sinalização do VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) é a responsável por gerar a resistência à apoptose nas células CLL B que segregam o VEGF e expressam os receptores VEGF. O VEGF é uma sub-família de factores de crescimento, sendo proteínas de sinalização envolvidas, na vasculogénese e na angiogénese. Estes investigadores encontraram indução da apoptose de modo mais significativo em células CLL B, incubadas com anticorpo direccionado para o VEGF (anticorpo anti-VEGF – Avastin; bevacizumab). Nos trabalhos que realizaram, estes cientistas ligaram anticorpo VEGF às AuNPs (formação de um nanoconjugado) e determinaram a sua capacidade de matar as células CLL B. Este grupo concluiu que as células tratadas com os nanoconjugados de Au apresentavam uma diminuição das proteínas anti-apoptóticas e exibiam clivagem do substrato celular PARP (*poly-ADP-ribose polymerase*), indicando que as células estão a entrar em estado apoptótico. As AuNPs não funcionalizadas também tinham a capacidade de induzir alguns níveis de apoptose nas células CLL B. Estes investigadores confirmaram, ainda, que as AuNPs conjugadas com o anti-VEGF eram internalizadas nas células CLL B em endossomas primários e secundários e em corpos multivesiculares (Mukherjee *et al.*, 2007).

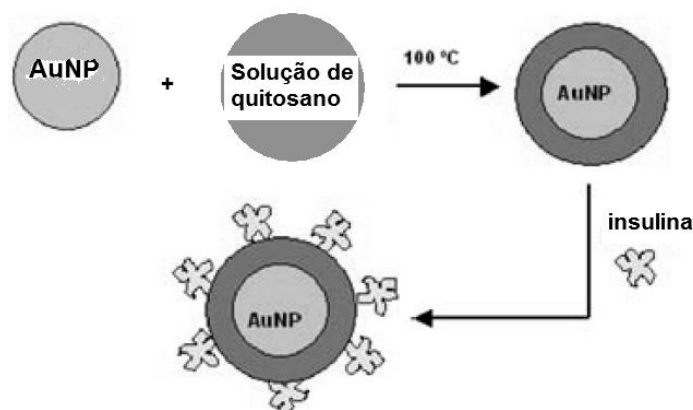
As AuNPs têm sido utilizadas como agentes de contraste, *in vitro*, devido à sua capacidade de dispersar a luz visível. Sokolov e colaboradores usaram com sucesso AuNPs, conjugadas com anticorpos anti-EGFR (*anti-epidermal growth factor receptor*), para marcar biópsias cervicais na identificação de lesões cancerígenas (Sokolov *et al.*, 2003; Cuenca *et al.*, 2006).

As AuNPs demonstraram ter um enorme potencial como agentes de terapia fototérmica, ilustrado na Figura 5, e como agentes de imagiologia em sistemas vivos. Na maior parte destas aplicações, tanto na imagiologia como na terapêutica, as AuNPs têm tamanho igual ou superior a 5 nm. Para AuNPs maiores que 5 nm, assume-se que o Au é quimicamente inerte como o Au de grandes dimensões (Alkilany e Murphy, 2010).



**Figura 5** – Liberação fototérmica de um fármaco a partir de uma microcápsula contendo AuNPs na sua cobertura (a); estimulação fototérmica da microcápsula e ruptura do seu revestimento (b); (c) liberação da molécula terapêutica (adaptado de Al-Qadi e Remuñán-López, 2009).

As AuNPs apresentam um extraordinário potencial como agentes fototerapêuticos no tratamento do cancro, assim como para a elaboração de nanoestruturas úteis para o transporte e vectorização selectiva de fármacos e macromoléculas terapêuticas, como a insulina (Joshi *et al.*, 2006; Bhumkar *et al.*, 2007) (*vide* Figura 6) e na terapia génica (veiculação de plasmídeos, DNA, RNA) (Bhattacharya e Mukherjee, 2008; Chen *et al.*, 2008; Jain *et al.*, 2008). Também se destaca a utilidade das AuNPs na elaboração de “sistemas inteligentes de transporte” que permitem controlar, no espaço e no tempo, a liberação do composto terapêutico associado, já que esta é desencadeada por um estímulo biológico interno, como, por exemplo, uma variação da concentração de glutatona entre o exterior e o interior da célula, ou liberação mediada por uma alteração de pH. A liberação de um fármaco pode, também, ser desencadeada por um factor externo, como uma fonte de luz *laser* (Verma *et al.*, 2004; Hong *et al.*, 2006; Gunnarsdottir *et al.*, 2002; Han *et al.*, 2006a; Han *et al.*, 2006b).



**Figura 6** – Diagrama esquemático que representa uma AuNP com revestimento primário de um polímero de quitosano e a associação posterior de insulina (adaptado de Al-Qadi e Remuñán-López, 2009).

Nos últimos anos, a comunidade científica dirigiu notáveis esforços na investigação e aplicação das AuNPs na detecção precoce, diagnóstico e tratamento do cancro, como o comprovam os inúmeros trabalhos publicados nesta área (Jain *et al.*, 2008; Paciotti *et al.*, 2004; Paciotti *et al.*, 2006; Loo *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2006a; Huang *et al.*, 2006b; Huang *et al.*, 2007a; Huang *et al.*, 2007b; Jain *et al.*, 2006a; Jain *et al.*, 2007; Cai *et al.*, 2008).

Um exemplo da aplicação das AuNPs no tratamento de cancro é descrito num estudo desenvolvido por Cai e colaboradores. Trata-se de um caso de vectorização activa (hipertermia dirigida) utilizando AuNPs de 30 nm de diâmetro, estabilizadas com citrato e funcionalizadas com a proteína EGFR (receptores do factor humano de crescimento epidérmico). Estes nanossistemas tinham como alvo as células HSC3 (células de carcinoma humano oral escamoso). A irradiação *laser* das AuNPs funcionalizadas (AuNPs-anti-EGFR) provocou a destruição selectiva das células cancerígenas, aumentando para 20 vezes a eficácia da terapia fototérmica (Cai *et al.*, 2008).

A terapia génica representa uma nova estratégia para o tratamento de diversas doenças genéticas ou adquiridas, sendo também muito promissora no tratamento do cancro (Miller, 1992). As AuNPs constituem uma aposta interessante neste tipo de tratamento. Estudos recentes demonstram que as AuNPs melhoram a estabilidade do DNA frente à degradação enzimática, química e física, reduzem a possibilidade da sua identificação por parte do sistema imune do receptor, aumentam a eficácia de transfecção intracelular e permitem o transporte de uma grande quantidade de material genético devido à grande superfície das NPs em relação ao seu volume (Han *et al.*, 2006a; Han *et al.*, 2006b; McIntosh *et al.*, 2001; Sandhu *et al.*, 2002; Thomas e Klibanov, 2003b). O DNA pode ser facilmente modificado com tióis (-SH) para ser incorporado nas AuNPs por

ligações do tipo covalente, dando lugar a nanoconjugados. Estes autores observaram que aumentando a lipofilia do sistema nanotransportador, aumenta a internalização celular e, conseqüentemente, a eficácia da transfecção. Na elaboração de veículos de DNA, com o objectivo de internalização nas células, normalmente, recorria-se à utilização de materiais policatiónicos. Em estudos realizados em 2006, por Rosi e colaboradores, ficou demonstrado que AuNPs modificadas com oligonucleótidos, com carga superficial negativa, são eficazes na regulação genética. Estas AuNPs, estáveis quanto à degradação enzimática, são captadas pelas células por um processo endocítico, que é iniciado pela adsorção de numerosas proteínas séricas na superfície das AuNPs (Rosi *et al.*, 2006; Giljohann *et al.*, 2007).

## 5. Caracterização das NPs para Avaliação Toxicológica

Actualmente, já existem diversas técnicas e métodos para testar, de forma conveniente, materiais com tamanho superior a 100 nm. O grande desafio começa quando os testes de caracterização e avaliação toxicológica têm como objecto de estudo os nanomateriais.

As características dos nanomateriais como a sua forma, dispersão, composição, propriedades superficiais, reactividade química determinam que a sua avaliação toxicológica seja uma área nova a desenvolver (Fadeel e Garcia-Bennett, 2009; [www.nist.gov](http://www.nist.gov)).

Em relação aos testes já validados para os outros materiais vários problemas se colocam na sua aplicação às NPs. A relação entre o volume das NPs sólidas e a sua área superficial confere-lhes propriedades específicas, tornando-as muito activas nas reacções químicas pela grande superfície de exposição aos respectivos reagentes. Assim, antes de se submeterem as NPs aos ensaios toxicológicos é imperativo que as mesmas sejam bem caracterizadas, quer relativamente às suas propriedades físicas como químicas, caracterização essa realizada de forma estruturada e parametrizada, para que se adaptem os testes toxicológicos a estes novos materiais.

Um problema que se coloca a quem trabalha na área da nanotoxicologia é definir quais os parâmetros físico-químicos mais relevantes a caracterizar para as NPs a testar, para posteriormente, realizar testes que produzam resultados que sejam passíveis de serem interpretados e reprodutíveis (Powers *et al.*, 2007; Fadeel e Garcia-Bennett, 2009).

Em contraste com as substâncias químicas solúveis, as NPs podem depositar-se na solução onde estão dispersas, designada neste trabalho por veículo, dispersar-se e

agregar-se de modo distinto, de acordo com o seu tamanho, densidade e superfície físico-química (relacionada com a carga e revestimento) (Oberdörster *et al.*, 2007).

Um agregado de NPs é definido por “um conjunto de partículas fortemente ligadas entre si ou partículas que fundiram, daí resultando uma área de superfície total que pode ser significativamente menor quando comparada com a soma das áreas da superfície das NPs consideradas individualmente”. Um aglomerado de NPs é “uma colecção de partículas ou agregados ligados de modo fraco entre si, ou uma mistura de partículas e agregados ligados também por ligações fracas, decorrendo daí que a área total deste conjunto é similar à soma das áreas de superfície dos componentes quando considerados individualmente” (British Standards Institution, 2007). Com base nestas definições podemos concluir que os aglomerados de NPs podem ser facilmente separados por agentes dispersantes ou com o uso de alguma energia (vortex ou sonicação curta), enquanto a destruição dos agregados é difícil de conseguir (Stone *et al.*, 2009).

Mas esta dinâmica das NPs no meio onde estão dispersas, não é só influenciada pelas propriedades físico-químicas das AuNPs *per se*, mas também pelas propriedades do meio onde estão dispersas (viscosidade, densidade, presença de proteínas). As NPs sintetizadas, quer à escala laboratorial quer à escala industrial, não são desenvolvidas para serem compatíveis com os meios de cultura celular utilizados nos métodos instrumentais *in vitro*, uma vez que se trata de suspensões que não estão a um pH fisiológico e, muitas vezes, foram adicionados à suspensão agentes estabilizantes, que também podem apresentar citotoxicidade. O ajuste do pH nestas soluções para o valor fisiológico pode levar à sua desestabilização, levando a alterações no estado de dispersão das suspensões de NPs, conduzindo à aglomeração ou desaglomeração das mesmas, uma vez que são suspensões muito sensíveis às alterações de pH e dos iões em solução (Schulze *et al.*, 2008).

Estes factos afectam de modo significativo a quantidade de NPs que chega às células. A definição de concentração de NPs nos sistemas *in vitro* é mais dinâmico, mais complicado, e não permite tantas comparações entre partículas de diferentes tipos, como se pode fazer com os compostos solúveis de maiores dimensões. Sempre que se realizam trabalhos *in vitro* para avaliar a citotoxicidade de NPs e se efectuam estudos de dose-resposta dessas NPs com um determinado tipo de células, é necessário fazer um estudo exaustivo sobre as NPs a testar. Para que os estudos sejam conduzidos de forma adequada, deve avaliar-se o comportamento das NPs quando são colocadas no meio de cultura celular suplementado e a estabilidade das diferentes soluções diluídas com as quais as células serão incubadas (Teeguarden *et al.*, 2007).

Nos estudos *in vitro*, as propriedades do meio de cultura e características das NPs que têm impacto no seu transporte para células, podem organizar-se em três grupos: processos que afectam a difusão das NPs, processos que afectam a deposição gravitacional das NPs e processos que afectam o estado de aglomeração das NPs. Vários factores influenciam a taxa e o grau de aglomeração das AuNPs no veículo onde estão dispersas. A concentração das NPs afecta a taxa e o grau de aglomeração influenciando a taxa das interações partícula - partícula. As propriedades das NPs como o seu potencial zeta ( $\zeta$ ), forma e hidrofobia/hidrofilia podem também ter impacto na taxa de aglomeração das NPs, uma vez que influenciam as suas propriedades repulsivas ou atractivas. As características de fluidez da preparação e a duração do método de mistura ou sonicação, são características do procedimento laboratorial que afectam, de igual modo, o estado de aglomeração das NPs. Outro fenómeno que também influencia o estado de aglomeração das NPs é a presença de proteínas no meio de cultura. Este facto pode criar uma força repulsiva estérica e reduzir a rede de interações de atracção entre NPs, alterando o seu estado de aglomeração (Limbach *et al.*, 2005; Teegarden *et al.*, 2006).

Para estabilizar e prevenir a aglomeração das NPs são, frequentemente, adicionados albumina de soro bovino (BSA- *bovine serum albumin*) e soro bovino fetal (FBS - *fetal bovine serum*) às soluções aquosas de NPs, incorporando este suplemento no meio de cultura celular, antes da adição das NPs, procedendo à sonicação da mistura pelo menos durante 10 minutos (Richter *et al.*, 2007; Murdock *et al.*, 2008; Schulze *et al.*, 2008; Foucaud *et al.*, 2007; Porter *et al.*, 2008; Stone *et al.*, 2009).

## 6. Estudos de Citotoxicidade e de Internalização de AuNPs

Os primeiros estudos de avaliação da citotoxicidade de NPs foram executados com os primeiros protótipos destes nanomateriais, de que são exemplos as NPs de  $\text{TiO}_3$  (Long *et al.*, 2006), Fullerenos (C60) (Sayes *et al.*, 2005), *Quantum Dots* (Derfus *et al.*, 2004), Nanotubos de carbono (Dumortier *et al.*, 2006) e AuNPs (Connor *et al.*, 2005; Goodman *et al.*, 2004).

Desde então, a citotoxicidade de AuNPs tem sido objecto de muitos estudos que originaram um grande número de publicações (Tabela 2). Esses estudos relatam ensaios *in vitro*, desenvolvidos em diferentes linhas celulares, com AuNPs de variadas formas e tamanhos, revestidas com diversos grupos funcionais e apresentando cargas superficiais diferentes. Apesar de os ensaios *in vitro* serem fáceis de realizar e permitirem um controlo eficaz de muitas variáveis, não substituem, de forma alguma, os ensaios *in vivo*,

por não avaliarem as complexas interações que ocorrem num organismo vivo. Os seus resultados permitem, no entanto, compreender os mecanismos de toxicidade e de internalização das AuNPs a nível celular, mas não podem ser linearmente extrapolados para situações *in vivo* (Alkilany e Murphy, 2010).

A análise da citotoxicidade de determinadas AuNPs num determinado contexto (com uma determinada linha celular, com condições parametrizadas para o ensaio *in vitro*), representa informações científicas muito importantes mas, consideradas insuficientes, quando isoladas, porque não informam sobre o impacto dessas AuNPs no organismo vivo, nem reflectem os seus efeitos tóxicos nesse mesmo organismo, sobretudo no caso de exposições prolongadas ou crónicas. Todos os ensaios devem ser bem desenhados e ponderados, todos os aspectos funcionais das AuNPs devem ser avaliados, para que as alterações biológicas verificadas possam ser interpretadas como resultados credíveis da sua presença (Villiers *et al.*, 2009).

É evidente que a citotoxicidade das AuNPs foi sempre uma grande preocupação dos investigadores, uma vez que avaliar a sua biocompatibilidade é crucial para estabelecer uma relação sustentada entre a nanotecnologia e a biomedicina (Shukla *et al.*, 2005; Fadeel e Garcia-Bennett, 2009). Surgiram, então, opiniões contraditórias a respeito da citotoxicidade das AuNPs. Alguns investigadores descreveram estudos que sustentam a sua não toxicidade (Connor *et al.*, 2005; Shukla *et al.*, 2005; Chithrani *et al.*, 2006; Alkilany e Murphy, 2010), enquanto outros investigadores demonstraram nos seus trabalhos que as AuNPs podem apresentar, em determinados contextos, toxicidade (Pernodet *et al.*, 2006; Goodman *et al.*, 2004). Assim, pensam que as AuNPs podem apresentar efeitos adversos a nível celular resultantes da sua interação com os componentes celulares, nomeadamente com a membrana, com as mitocôndrias ou com o núcleo. Esses efeitos adversos podem incluir alterações no DNA ou nos organelos celulares, *stress* oxidativo, apoptose, mutagénese e indução ou inibição enzimática (Unfried *et al.*, 2007; Aillon *et al.*, 2009; Pan *et al.*, 2009; Jia *et al.*, 2009; Alkilany e Murphy, 2010). Alguns estudos realizados com o objectivo de avaliar a toxicidade das AuNPs, evidenciaram que há numerosos parâmetros que podem influenciar a sua toxicidade (Warheit *et al.*, 2008), como por exemplo o tamanho, a forma, a rugosidade, o estado de agregação, o revestimento, a concentração, entre outros (Warheit *et al.*, 2008; Villiers *et al.*, 2009). Nesta perspectiva, a generalização dos resultados é muito difícil ou mesmo impossível.

Em suma, pode afirmar-se que a citotoxicidade das AuNPs depende dos parâmetros já mencionados, os quais também influenciam e condicionam a sua internalização nas células (Yen *et al.*, 2009).

Partindo destes pressupostos, descrevem-se alguns estudos considerados importantes referências no desenvolvimento dos ensaios experimentais que dão corpo a esta dissertação.

Para investigar especificamente o *stress* induzido e a resposta imunológica de macrófagos RAW264.7, expostos a AuNPs aquosas [Au (0)], Shukla e colaboradores (2005), desenvolveram um estudo que lhes permitiu concluir que as AuNPs, contrariamente aos fármacos anti-reumáticos baseados em Au (I) e Au (III), são inertes e não são tóxicas para as células (Griem *et al.*, 1985; Mirabelli *et al.*, 1985). Neste estudo, verificaram que as AuNPs [Au (0)] entram, presumivelmente, nas células por endocitose, reduzem o nível das espécies reactivas de oxigénio e de azoto e não provocam secreção de citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL 1 $\beta$ . Estes mecanismos atestam a sua utilidade para aplicação biomédica (Shukla *et al.*, 2005; Alkilany e Murphy, 2010). Antes de executarem os ensaios de citotoxicidade nos macrófagos, estes cientistas desenvolveram uma detalhada análise microscópica para identificar a via de internalização das AuNPs estudadas em função do tempo. Desta forma, a via endocítica de internalização das AuNPs foi comprovada por variadas técnicas microscópicas como a microscopia de força atómica (AFM), a microscopia confocal com laser (CFLSM) e a microscopia de transmissão electrónica (TEM) (Shukla *et al.*, 2005). O mesmo grupo de investigadores constatou também, que as AuNPs em altas concentrações, inibem a produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS) e de espécies reactivas de azoto (RNS). Estas constatações preconizam a versátil utilização das AuNPs [Au (0)] na terapêutica e em fórmulas farmacêuticas baseadas no Au, num futuro relativamente próximo (Shukla *et al.*, 2005).

Em relação ao mecanismo de internalização das AuNPs nos macrófagos, Shukla e colaboradores (2005) referem a pinocitose e a sua posterior localização subcelular em lisossomas, organizados à volta do núcleo sem entrarem nele. Estes investigadores, pretendendo confirmar se o mecanismo de internalização das AuNPs se fazia por endocitose, realizaram ensaios à temperatura de 4°C, verificando que, nestas condições, havia inibição da entrada de AuNPs nas células, situação que se revertia quando a exposição das células às AuNPs ocorria a 37°C. Estes resultados demonstraram claramente que a entrada das AuNPs nos macrófagos é por via endocítica, transporte activo que carece de energia para ocorrer. Através da marcação fluorescente das AuNPs dentro dos endossomas/lisossomas, este grupo de investigação, conseguiu demonstrar a sua biocompatibilidade com as células macrófagos RAW264.7. As AuNPs são biocompatíveis com os macrófagos RAW264.7 e não interferem na sua função celular, nem conduzem à morte por ruptura da membrana celular. Estes resultados foram



também confirmados através de imagens obtidas por AFM, CFLSM e TEM que demonstraram a presença da membrana nuclear e de outras membranas estruturais intactas, o que evidencia uma célula viável e metabolicamente activa (Shukla *et al.*, 2005).

Ainda em 2005, um grupo de investigadores liderado por Connor, utilizou nos seus ensaios de citotoxicidade com AuNPs, uma linha celular cancerígena humana de células leucémicas K562. Este grupo verificou que AuNPs esféricas de diferentes tamanhos (4,12 e 18 nm de diâmetro), revestidas por diferentes agentes (citrato, cisteína, glucose e biotina) não eram tóxicas para este modelo. As AuNPs de 18 nm que continham brometo de cetiltrimetilamónio (CTAB) causaram citotoxicidade nas células, no entanto, verificaram que essa toxicidade não era provocada pelas AuNPs mas pelo CTAB livre. Os ensaios de citotoxicidade foram efectuados pelo teste de MTT (3 - (4,5- Dimethylthiazol - 2- yl -2,5-diphenyltetrazolium bromide) com exposição contínua das células às AuNPs durante 3 dias (Connor *et al.*, 2005). O facto destes investigadores, (Connor *et al.*, 2005), não detectarem citotoxicidade das AuNPs, conduziu ao desenvolvimento de ensaios adicionais para verificar se as AuNPs seriam internalizadas nas células. Para responder a esta questão, foram executados ensaios com AuNPs de citrato de 18 nm, na concentração de 25  $\mu$ M sendo as células expostas durante 15 e 24 horas. Os resultados obtidos sugerem que as AuNPs de citrato são rapidamente internalizadas nas células. A entrada das AuNPs de citrato nas células foi confirmada por TEM, após exposição das células durante 1 hora. Da observação dessas microfotografias obtidas por TEM, Connor e seus colaboradores admitiram que as AuNPs estão agregadas em localização subcelular, em vesículas de endocitose. No entanto, esta ideia carece de confirmação pela realização de mais ensaios experimentais. Outra observação relevante, relatada por esta equipa de investigadores, diz respeito à manutenção da morfologia das AuNPs de citrato dentro das células cancerígenas de leucemia. Efectivamente, nas imagens ampliadas de microscopia electrónica, as AuNPs de citrato apresentam a mesma forma e um tamanho próximo daquele que tinham fora das células, esferas de 18 nm. Contudo os autores concluíram que é necessário efectuar mais ensaios para determinar com precisão se não ocorrem modificações nos grupos superficiais das AuNPs depois de contactarem com o ambiente celular (Connor *et al.*, 2005).

Em 2009, Villiers *et al.*, desenvolveram um estudo com o objectivo de verificar se as AuNPs revestidas de citrato (esferas de 10 nm de diâmetro), perturbavam as funções celulares em células dendríticas, obtidas da medula óssea de ratos. Estas células intervêm activamente nas respostas imunes, quer inatas, quer adquiridas, agindo como células capazes de apresentar o antigénio às células do sistema imune para que se

desencadeie a resposta imunológica. A análise da viabilidade celular das células dendríticas, depois da sua exposição a AuNPs revestidas de citrato, demonstrou que estas AuNPs não são tóxicas mesmo em altas concentrações (0,5 mM). Além do mais, o fenótipo das células dendríticas permanece inalterado depois da adição das AuNPs, indicando que não existe activação destas células provocada pelas AuNPs. Contudo, a análise das células ao nível intracelular revelou importantes quantidades de AuNPs acumuladas no compartimento endocítico, o que se pode justificar pela grande capacidade de fagocitose destas células. Estes investigadores observaram que a secreção de citocinas é significativamente alterada depois da internalização das AuNPs nas células, o que indica uma potencial perturbação da resposta imunológica, reduzindo, por exemplo, a secreção de uma interleuquina (IL 12p70) quando estas células são simultaneamente activadas pela adição de lipopolissacarídeo (LPS), antigénio que funciona, nesta experiência, como controlo positivo (Villiers *et al.*, 2009).

Em contraste com estes resultados, outros grupos de investigadores demonstraram que as AuNPs podem apresentar toxicidade. Por exemplo, Goodman e colaboradores descobriram que nanoesferas de Au, de 2 nm de diâmetro e carregadas positivamente, são tóxicas para determinadas concentrações. No mesmo trabalho, as mesmas NPs, com carga negativa na sua superfície, mostraram não ser tóxicas na mesma concentração e na mesma linha celular (células Cos-1, glóbulos vermelhos e culturas de *Escherichia coli*). Estes investigadores explicam esta discrepância com base no facto das AuNPs carregadas positivamente terem a capacidade de interagir com a membrana celular, carregada negativamente, conduzindo ao dano da mesma. Contudo, este grupo não estudou a interacção das AuNPs com o meio de cultura das células, nem com o veículo das mesmas (Goodman *et al.*, 2004).

Embora as AuNPs não sejam, geralmente, consideradas tóxicas (o Au metálico [Au (0)] é reconhecido como inerte e compatível), para Pan e colaboradores este facto não é uma realidade, como referem num trabalho publicado em 2009. Estes investigadores demonstraram que o diâmetro predominante de 1,4 nm faz com que as AuNPs sejam tóxicas em culturas celulares (células epiteliais: HeLa, células endoteliais: SK-Mel-28, Fibroblastos: L929 e Fagócitos: j774A1) (Pan *et al.*, 2007). Todavia, se as AuNPs apresentarem um diâmetro de 15 nm, ou diâmetros inferiores a 1 nm, são menos tóxicas, embora possuam a mesma composição química do núcleo e da superfície. Em 2009, estes cientistas apresentaram um estudo detalhado das reacções de resposta das células quando expostas a AuNPs de diâmetro de 1,4 nm, revestidas com *shells* de monosulfonato trifenílfosfatado (TPPMS), designadas por Au1,4MS. A resposta celular foi rápida e duradoura. As células internalizaram as AuNPs e desenvolveram uma forte

resposta de *stress* ao nível da membrana e da mitocôndria, provocando alterações na sua integridade, e induzindo a síntese de RNA mensageiro (mRNA). A morte celular, predominantemente por necrose, sugere, como principais causas de morte celular, um dano oxidativo intenso e alterações na permeabilidade mitocondrial. Estes autores descobriram que as AuNPs esféricas de 1,4 nm desencadeiam necrose, dano na mitocôndria, e induzem *stress* em todas as linhas celulares examinadas. As suas observações sugerem que estas AuNPs podem produzir espécies reactivas de oxigénio (ROS), que além de danificarem as membranas das mitocôndrias também danificam outras estruturas ao longo do seu trajecto dentro das células, incluindo lípidos da membrana celular, componentes da via endocítica, proteínas sintetizadas recentemente e DNA. Os estudos preconizados por estes investigadores vieram trazer esclarecimentos válidos à emergente área da nanotoxicologia, ao constatarem que a toxicidade depende do tamanho das AuNPs testadas (Pan *et al.*, 2009; Alkilany e Murphy, 2010).

No mesmo trabalho, Pan e colaboradores (2009), trataram as mesmas AuNPs com agentes anti-oxidantes como a N-acetilcisteína e a glutatona, incluindo estes revestimentos nas NPs. Para fazerem as suas experiências utilizaram a linha celular HeLa, células epiteliais cancerígenas do cérvix, incubadas com Au<sub>1,4</sub>MS e com AuNPs de tamanho idêntico mas revestidas com glutatona (Au<sub>1,1</sub>GSH). Os resultados obtidos revelaram que a GSH possui maior afinidade para se ligar ao Au que o ligando TPPMS e, adicionando uma mistura dos dois tipos de AuNPs (Au<sub>1,4</sub>MS; Au<sub>1,1</sub>GSH), estabelecem-se ligações do Au com a GSH e as AuNPs ficam assim revestidas com este ligando. Considerando que é na célula que se encontra a GSH como um dos antioxidantes naturais, expondo células a Au<sub>1,4</sub>MS, a GSH das células vai ligar-se a estas AuNPs, substituindo o TPPMS (efeito protector). Convém salientar que o TPPMS não demonstrou ser tóxico para as células HeLa se não estiver ligado às AuNPs. Assim, outra conclusão pode ser retirada deste estudo: tanto o tamanho como o revestimento das AuNPs são factores determinantes da sua citotoxicidade. A internalização das AuNPs também é condicionada e influenciada pelo seu revestimento (Pan *et al.*, 2009).

Turner *et al.*, também desenvolveram trabalhos no âmbito da capacidade catalítica de AuNPs de diâmetro inferior a 2 nm, cujos resultados foram publicados na Nature (Turner *et al.*, 2008). Pela análise e interpretação dos resultados, verificaram que AuNPs de diâmetro inferior a 2 nm apresentavam uma reactividade química que não encontraram em partículas de Au de maior tamanho (Turner *et al.*, 2008; Alkilany e Murphy, 2010). Este grupo de investigação demonstrou que as AuNPs de tamanhos extremamente pequenos (diâmetro inferior a 2 nm) imobilizadas em materiais química e electronicamente inertes têm a capacidade de activar o O<sub>2</sub> para desencadear uma

oxidação selectiva do estireno (hidrocarboneto aromático insaturado), presumivelmente pela dissociação do O<sub>2</sub> em átomos de oxigénio que iniciam a oxidação parcial. No entanto, AuNPs de tamanho superior ou superfícies aumentadas de Au são incapazes de desencadear o processo anteriormente descrito. Estas observações da actividade catalítica das AuNPs sugerem que esta característica é devida a uma alteração electrónica da estrutura intrínseca das AuNPs de tamanhos inferiores a 2 nm. A utilização das AuNPs como catalizadores é uma sugestão promissora (Turner *et al.*, 2008).

Os resultados discrepantes em relação à citotoxicidade das AuNPs são perfeitamente compreensíveis uma vez que os trabalhos desenvolvidos pelos vários grupos de investigadores englobam um grande número de variáveis: diferentes linhas celulares e AuNPs com propriedades físico-químicas muito distintas.

Patra e colaboradores, num trabalho publicado em 2007, relataram que AuNPs revestidas de citrato e com 13 nm de diâmetro são citotóxicas para uma linha celular humana de carcinoma pulmonar (A549). Em contraste com estes resultados, nas outras duas linhas testadas, BHK21 (células de rim de hamster bebé) e HepG2 (células humanas de cancro hepático), as mesmas AuNPs não provocaram citotoxicidade (Patra *et al.*, 2007). O facto das AuNPs de citrato induzirem especificamente a morte das células A549 sugere que as AuNPs não atingem todos os tipos de células de forma universal. Nos ensaios de observação da alteração da morfologia celular e nuclear para os 3 tipos de linhas celulares, os investigadores concluíram que houve modificações na morfologia celular e nuclear nas células A549 expostas por 48 horas às AuNPs com concentrações de 0 a 120 nM. Utilizando um microscópio de contraste de fases e microscópio de fluorescência, para verificar as alterações na morfologia do núcleo das células, observou-se que as células A549 ficavam com aparência circular depois de expostas às AuNPs e com condensação e fragmentação nuclear, não se observando alterações morfológicas significativas nas outras duas linhas celulares utilizadas (BHK21 e HepG2). Uma outra conclusão do trabalho deste grupo de investigadores, alicerçada em resultados de ensaios desenvolvidos por citometria de fluxo, relaciona a resposta das células às AuNPs em função da concentração. Verificou-se apoptose das células A549 e, nas concentrações mais elevadas de AuNPs, observou-se uma assimétrica acumulação das AuNPs na periferia do núcleo, sem se verificar a sua entrada neste organelo celular (confirmado por imagens de microscopia confocal). Neste trabalho, os investigadores não concluíram qual seria o exacto alvo das AuNPs nas células A549, mas este é o primeiro relato de citotoxicidade de AuNPs por apoptose. Este relato é encorajador, se pensarmos na versatilidade de utilização destas AuNPs na biomedicina, que de forma direccionada e controlada podem permitir a ablação fototérmica de alguns tipos de cancro. Estes

estudos também sugerem que, para alguns tipos de células, parecem existir receptores celulares ou subcelulares para AuNPs. A compreensão destas interações pode ser muito útil na aplicação destas AuNPs na medicina (Patra *et al.*, 2007).

Outro estudo, publicado em 2009, foi desenvolvido pela equipa de Mahmood e colaboradores. Os seus principais objectivos foram avaliar a resposta celular (osteócitos MLOY4 e células HeLa) *in vitro* a três tipos diferentes de NPs, em diferentes concentrações, sendo um destes uma AuNP. A primeira conclusão a que chegaram foi a de que as NPs eram internalizadas pelas células logo após as primeiras horas de incubação. Da observação microscópica realizada, em que fizeram a avaliação do efeito das NPs na morfologia celular, os resultados sugerem que a entrada das NPs resulta em alterações da forma das células, alteração essa que parece ser dependente do tipo de nanomaterial testado, da sua concentração e propriedades físico-químicas (Mahmood *et al.*, 2009). Outra descoberta interessante foi a de que a forma e o diâmetro dos nanomateriais, podem influenciar a taxa de internalização nas células devido às suas diferentes interações físicas com a membrana celular. Os nanomateriais testados para comparar os seus efeitos nas células foram nanotubos de carbono, AuNPs e AgNPs esféricas. Além do mais, a presença de vários grupos funcionais na superfície dos nanomateriais pode ter um impacto enorme na sua interação com as membranas celulares e com a capacidade de penetração dos mesmos nas células. Dos três tipos de NPs testados, os nanotubos de carbono são os que apresentaram maior citotoxicidade e tinham o menor tamanho, 1,2 nm. Os elevados níveis de citotoxicidade destas NPs pode ser explicada como o resultado do seu tamanho, forma tubular e composição química. Os resultados dos ensaios experimentais realizados por este grupo de investigação também sugerem que os nanomateriais e os agentes apoptóticos (como a dexametasona e o etoposido) parecem ter um efeito sinérgico, quando juntos, no mecanismo de indução do processo de apoptose nas células e activação das caspases 3 citoplasmáticas (proteases específicas do cisteinil aspartato). Este facto foi, pela primeira vez, descrito por este grupo de trabalho. Podemos concluir que os nanomateriais podem provocar a activação das caspases existentes nas células e desencadear a apoptose. Parece existir uma resposta apoptótica sinérgica quando as células estão expostas, simultaneamente, às NPs e a agentes apoptóticos, o que pode ser aplicados no desenvolvimento de novos tratamentos anti-cancerígenos (Mahmood *et al.*, 2009).

Li e colaboradores demonstraram que as AuNPs promovem inibição da proliferação de fibroblastos pulmonares embrionários de origem humana (linha celular MRC-5) por alteração da expressão genética e consequente dano do DNA, sem evidente indução de citotoxicidade (Li *et al.*, 2008). Este fenómeno foi igualmente descrito para outras linhas

celulares, como é caso da linha HeLa (Khan *et al.*, 2007). Nestas células foi descrita a internalização de AuNPs em agregados pela via endocítica dependente da clatrina, com formação de vesículas que se distribuem no citosol (Chithrani e Chan 2007; Li *et al.*, 2008). Uma vez que as vesículas não são encontradas no núcleo, desconhece-se ainda o mecanismo de interação das AuNPs com o DNA das células. Contudo, a produção de ROS seguida da inibição da expressão de genes reparadores do DNA foi proposta como um possível mecanismo explicativo desta interação (Li *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2007).

Na continuação dos trabalhos na mesma linha celular (fibroblastos de pulmão de fetos humanos - MRC-5), Li e colaboradores (2010) relatam as suas investigações *in vitro*, utilizando AuNPs (20 nm). Concluíram que as AuNPs induzem autofagia e *stress* oxidativo nas células (peroxidação lipídica e oxidação proteica). Fizeram, também, os perfis genéticos dos marcadores de *stress* oxidativo e procuraram as evidências de que há formação de autofagossomas. Estes investigadores pensam que o tratamento dos fibroblastos com AuNPs induz dano oxidativo nestas células pulmonares, reunindo uma grande quantidade de antioxidantes e proteínas de resposta ao *stress*, numa tentativa de preservar a célula. Como a presença de AuNPs pode criar um ambiente oxidante, isto influencia os mecanismos de resposta ao *stress* oxidativo celular e, ao mesmo tempo, induz a formação de autofagossomas, possivelmente com a função de tentar proteger a célula de sucumbir ao *stress* oxidativo de que está a ser alvo (Li *et al.*, 2010).

Em 2009, o grupo de investigação liderado por Singh, desenvolveu um estudo sistemático de avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade de AuNPs e de AgNPs, funcionalizadas com um conjugado glicolipídico. Foi testada a citotoxicidade destas nanopartículas metálicas em células HepG2, utilizando o teste de redução do MTT, a sua genotoxicidade foi avaliada pelo ensaio COMETA, que permite avaliar de forma qualitativa e quantitativa os danos na molécula de DNA. As conclusões retiradas dos ensaios de MTT, em que as HepG2 foram expostas a soluções de concentrações entre 0-100  $\mu$ M (Au), com AuNPs revestidas do glicolípido, por períodos de 24, 48 e 72 horas, referem que essas AuNPs não são tóxicas para as células HepG2 nas concentrações até 100  $\mu$ M. Acrescenta-se que as AuNPs demonstraram possuir maior biocompatibilidade que as AgNPs, para as mesmas concentrações (Singh *et al.*, 2009).

Outro aspecto importante da abordagem da aplicação das AuNPs à biomedicina consiste em investigar qual é a via de internalização das AuNPs nas células e a sua subsequente localização intracelular (Shukla *et al.*, 2005).

Sempre que se pretende estudar a citotoxicidade de NPs, é necessário avaliar se elas são ou não internalizadas pelas células que nos servem de modelo *in vitro*, porque os resultados obtidos serão, posteriormente, interpretados nesse contexto (Chithrani *et al.*,

2006). Chithrani *et al.*, 2006, referem alguns aspectos que, em sua opinião, fundamentam a importância atribuída aos estudos de internalização de NPs:

- Permitem caracterizar a toxicidade das NPs. Se as NPs não entrarem nas células não existe uma probabilidade muito grande de elas serem tóxicas para as células ou alterarem as funções celulares;
- Contribuem com informação útil para a síntese de NPs. Para utilização na biomedicina é necessário que as NPs tenham a capacidade de atingir o objectivo e o alvo para que foram concebidas (imagiologia, cedência e transporte de fármacos, aplicações terapêuticas, entre outras);
- Informam sobre o seu destino no organismo, depois de cumprida a acção para a qual foram administradas (ensaios de farmacocinética, quantidades de NPs acumuladas nos vários tipos de células e a nível subcelular onde especificamente elas se acumulam, entre outros aspectos);
- Servem de orientação aos investigadores envolvidos na síntese de NPs multifuncionais, para que ao idealizarem NPs com um fim específico, consigam viabilizá-las no seu tamanho, forma, entre outros aspectos.

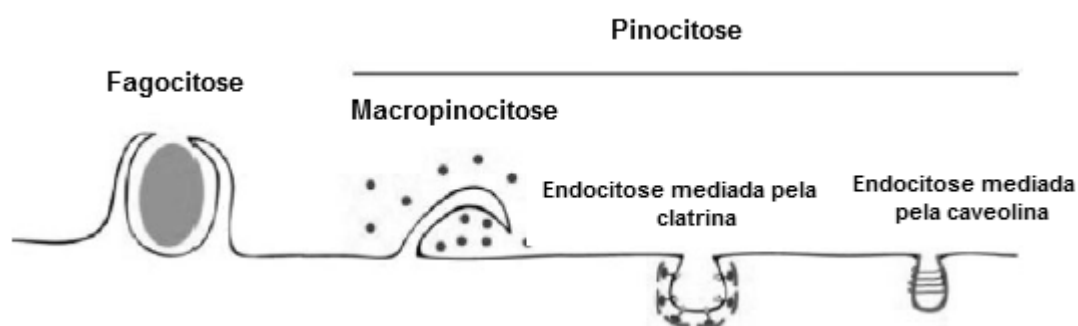
Os efeitos tóxicos das NPs estão relacionados com a capacidade destas catalisarem a produção de espécies reactivas de oxigénio (Nel *et al.*, 2006; Xia *et al.*, 2006) e por se ligarem irreversivelmente às membranas ou DNA (Tsolis *et al.*, 2005). Estes efeitos tóxicos provocam interferências a muitos níveis do metabolismo celular, mecanismos de sinalização e alterações genéticas.

Todos os estudos até então realizados apontam para um maior número de interferências das NPs a nível intracelular do que a nível extracelular, tornando imprescindível determinar não só a sua via de internalização, mas também quais as características e propriedades físico-químicas que determinam a entrada deste tipo de materiais nas células. Apesar de nos últimos anos se terem desenvolvido muitos trabalhos neste sentido, ainda não se tem um conhecimento muito preciso sobre os mecanismos de entrada das NPs nas células (Alberola e Rädler, 2009).

Acredita-se que as NPs se movimentam e distribuem no organismo humano, ou noutros ambientes biológicos, de modo rápido. Um grande número de publicações, neste domínio, referem que estes nanomateriais têm a capacidade de penetrar e se acumular em diferentes tecidos (Liu *et al.*, 2008), ou são sequestrados em vários organelos e compartimentos intracelulares. Vários estudos indicam diferentes mecanismos de sequestro de NPs pelas células, acreditando-se ser a endocitose o processo mais provável de internalização (Geiser *et al.*, 2005; Rothen-Rutisshauer *et al.*, 2006;

Mahmood *et al.*, 2009; Chithrani e Chan, 2007; Chithrani *et al.*, 2006). A endocitose das NPs pode conduzir à ligação das mesmas com alvos intracelulares, o que pode causar alterações na sinalização celular, motilidade e metabolismo (Mahmood *et al.*, 2009). Estas alterações podem ser aplicadas na biomedicina com fins terapêuticos, como é o caso do tratamento de cancros, mas também podem ser encaradas como efeitos secundários a evitar.

Foram descritos dois tipos de mecanismos de entrada das NPs nas células: a fagocitose, mecanismo de entrada de partículas de grande tamanho, restrita a determinado tipo de células e a pinocitose, mecanismo que pode ser executado por todo o tipo de células. A pinocitose pode ocorrer, pelo menos, por quatro mecanismos diferentes: macropinocitose, entrada de partículas de tamanho superior a 1  $\mu\text{m}$ , endocitose mediada por clatrina, entrada de partículas de, aproximadamente, 120 nm, endocitose mediada por caveolina, entrada de partículas de, aproximadamente, 60 nm e endocitose independente da clatrina e caveolina, mecanismo referido para a entrada de partículas de dimensões que rondam os 90 nm. A endocitose é um mecanismo de internalização caracterizado pela inclusão das NPs em vesículas membranares, não se observando contacto das NPs com o citosol das células. Este mecanismo de internalização está dependente das características físico-químicas NPs (tamanho, forma, propriedades físico-químicas do revestimento e seu arranjo conformacional na superfície da NP, carga, estado de dispersão, pureza) e das células utilizadas como modelo experimental, assim como das condições de incubação das mesmas, Figura 7 e Tabela 1 (Luccardini *et al.*, 2007; Conner e Schmid, 2003, Verma e Stellaci, 2010).



**Figura 7** – Principais vias endocíticas (adaptado de Verma e Stellaci, 2010).

Foi demonstrado que a internalização de NPs mediada por um receptor é um mecanismo extremamente dependente do tamanho das NPs, considerando-se níveis de entrada óptimos para NPs com um raio da ordem dos 25 nm (Conner e Schmid, 2003, Jiang *et al.*, 2008; Chithrani *et al.*, 2006; Gao *et al.*, 2005; Chithrani e Chan, 2007).

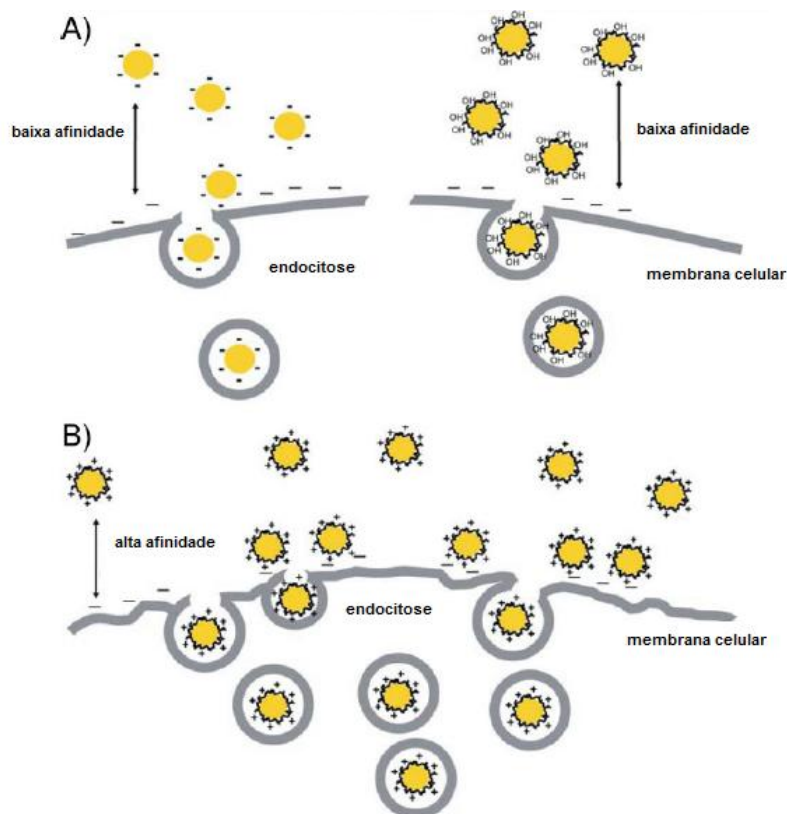


Uma breve descrição das principais vias de internalização por endocitose está descrita na Tabela 1.

**Tabela 1** – Principais tipos de endocitose (adaptado de Verma e Stellaci, 2010).

<b>Tipo de endocitose</b>	<b>Mecanismo</b>	<b>Tamanho da vesícula formada</b>
<b>Fagocitose</b>	Internalização de partículas sólidas, como bactérias e leveduras por células especializadas	Dependente do tamanho das partículas captadas
<b>Pinocitose</b>	Entrada de moléculas extracelulares em solução, existem muitas vias de pinocitose (abaixo mencionadas)	Dependente do tamanho das partículas captadas
<b>Macropinocitose</b>	Englobamento de grandes porções de fluidos, pela formação de saliências membranares	>1 $\mu\text{m}$
<b>Endocitose mediada pela clatrina</b>	Concentração de receptores transmembranares e ligandos em “poços revestidos” na membrana plasmática, formados pelo conjunto das proteínas citosólicas, sendo a clatrina a principal unidade	$\pm 120 \text{ nm}$
<b>Endocitose mediada pela caveolina</b>	Invaginações em forma de balão na membrana plasmática, que medeia a entrada de moléculas extracelulares na célula pela ligação específica a um receptor	$\pm 50- 60 \text{ nm}$

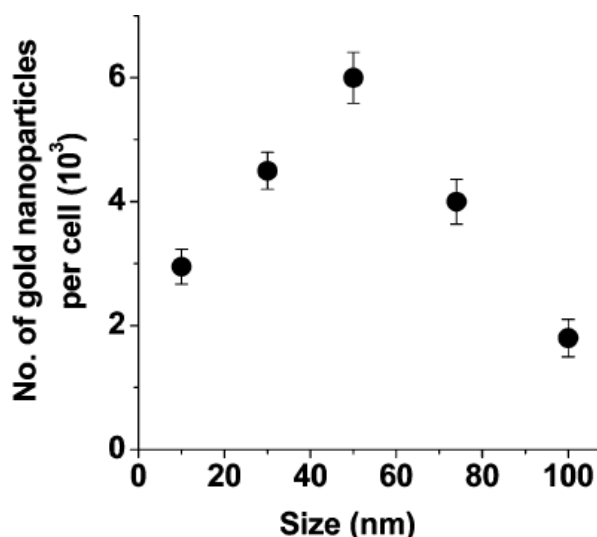
A Figura 8 ilustra esquematicamente a influência da carga superficial das AuNPs na sua afinidade para interagir com a membrana das células e, posteriormente, conduzir à sua internalização das AuNPs.



**Figura 8** – Ilustração esquemática de AuNPs com diferentes cargas em células. A) AuNPs revestidas de citrato e AuNPs revestidas de PVA (carga superficial negativa) demonstram baixa afinidade para interagir com a membrana celular. B) AuNPs revestidas de hidroclorato de polialiamina possuem uma elevada afinidade de ligação à membrana citoplasmática (adaptado de Verma e Stellaci, 2010).

Os primeiros estudos da cinética de internalização de NPs nas células foram desenvolvidos por Chithrani e colaboradores em 2006, utilizando, como modelo, AuNPs. A opção por estas NPs reside no facto de serem sintetizadas numa grande diversidade de tamanhos (1-100 nm de diâmetro) e com inúmeras formas. Outra vantagem da utilização de AuNPs baseia-se na sua fácil caracterização pelas técnicas de Espectrofotometria de Ultravioleta/visível (UV-vis), Espectroscopia de emissão atômica com atomização por plasma (*Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy* – ICP-AES) e Microscopia de Transmissão Electrónica (TEM). Estes investigadores desenvolveram um estudo cujo objectivo era relacionar o tamanho, a forma, a concentração e tempo de incubação com a cinética de internalização das AuNPs nas

células. Para atingir este objectivo, incubaram células HeLa com AuNPs de vários tamanhos e formas, durante 6 horas em meio de cultura *Dulbecco's Minimum Essential Media* (DMEM), suplementado com 10% de soro (FBS). A determinação da concentração de Au foi determinada por ICP- AES. Para converter o número de átomos de Au em número de AuNPs, estes investigadores utilizaram uma série de equações matemáticas (Chithrani *et al.*, 2006). Na Figura 9, o gráfico relaciona o número de AuNPs internalizadas por célula, com o seu tamanho, mostrando que a internalização das AuNPs pelas células é extremamente dependente do seu tamanho. O valor máximo de internalização das AuNPs pelas células HeLa, ocorreu para AuNPs de 50 nm (Chithrani *et al.*, 2006).



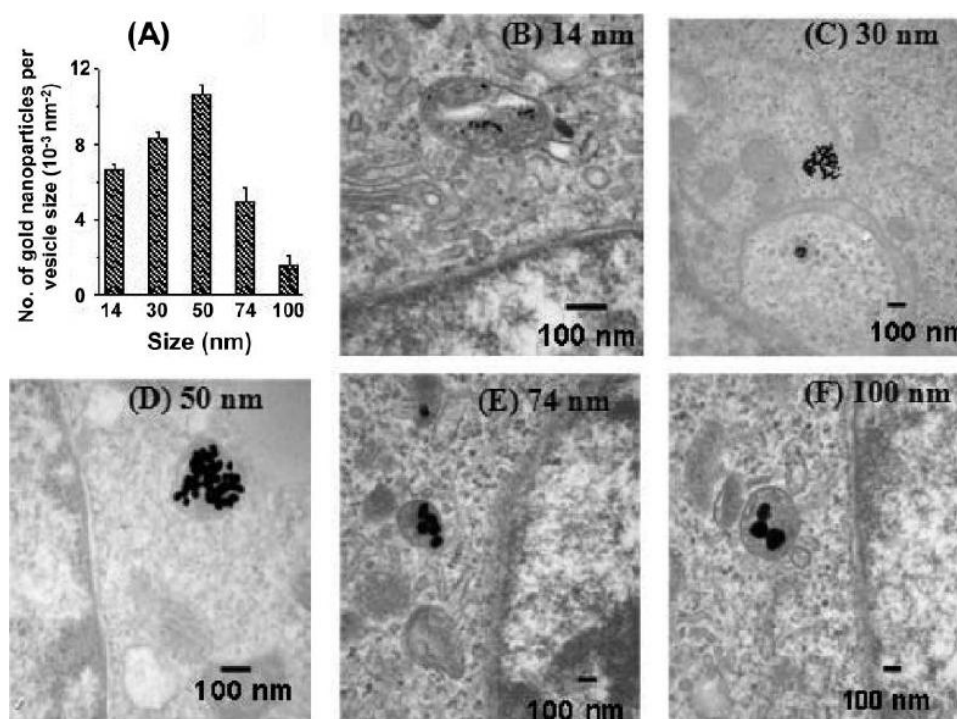
**Figura 9** – Internalização das AuNPs em função do seu tamanho (Chithrani *et al.*, 2006).

A Figura 10 apresenta imagens de células HeLa, obtidas por TEM, no interior das quais se visualizam AuNPs de tamanhos compreendidos entre 14 e 100 nm, agrupadas dentro de vesículas no citoplasma. Pode observar-se que as AuNPs não se encontram dentro do núcleo. Numa mesma célula podem observar-se múltiplas vesículas contendo AuNPs. Dentro das vesículas as AuNPs parecem estar monodispersas [Figura 10 (B-F)].

O gráfico de barras representado na Figura 10 (A) mostra a relação entre o número de AuNPs, por tamanho de vesícula, em função do tamanho das AuNPs (Chithrani *et al.*, 2006).

Com base nos resultados dos ensaios desenvolvidos por Chithrani *et al.*, com o objectivo de avaliar a citotoxicidade das AuNPs (ensaio de exclusão do Azul de Tripano), estes investigadores concluíram que as AuNPs testadas entram nas células HeLa e são tóxicas, o que está de acordo com os resultados obtidos por outros grupos de

investigação (Chithrani *et al.*, 2006; Connor *et al.*, 2005; Shukla *et al.*, 2005; Goodman *et al.*, 2004).



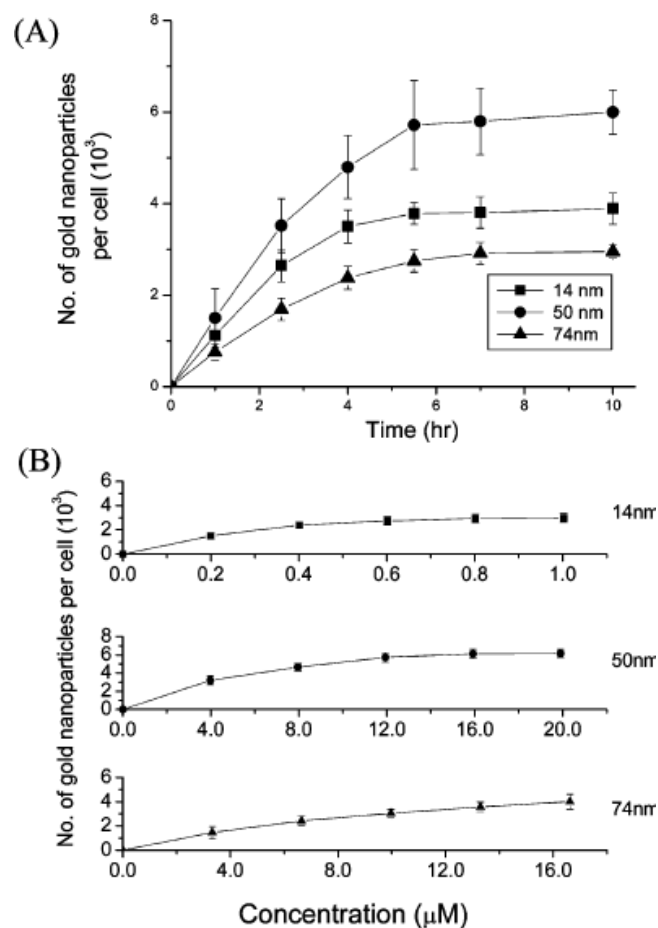
**Figura 10** – Imagens TEM e quantificação das AuNPs nas células. (A) Gráfico que relaciona o número de AuNPs por diâmetro da vesícula em função do seu tamanho. (B-F) Imagens TEM das AuNPs com tamanhos de 14,30,50,74 e 100 nm internalizadas em vesículas de células HeLa, respectivamente; (Imagens TEM são gravadas na voltagem de 75 KV com Hitachi H7000) (Chithrani *et al.*, 2006).

Os gráficos, abaixo representados, representam a relação entre a velocidade de internalização de AuNPs em células HeLa e o respectivo tempo de exposição, Figura 11 (A). Verifica-se que a internalização das AuNPs nas células HeLa aumenta significativamente nas primeiras 2 horas, diminuindo gradualmente até atingir uma fase estacionária (*plateau*) às 4 - 7 horas de exposição.

Na Figura 11 (B) estão representados 3 gráficos que relacionam a internalização das AuNPs nas células com a sua concentração (AuNPs com diâmetros de 14, 50 e 74 nm). Comparando os resultados expressos nestes 3 gráficos verifica-se que a internalização das AuNPs aumenta com a concentração para os 3 tamanhos de AuNPs testadas, no entanto, esses valores são mais elevados para as AuNPs de 50 nm e mais baixos para as AuNPs de 14 nm (Chithrani *et al.*, 2006).

O mecanismo de entrada das AuNPs, sugerido pelo grupo de trabalho de Chithrani, é a via de endocitose mediada por receptor (*receptor-mediated endocytosis pathway*, RME). Nesta via de entrada de substâncias nas células, o ligando que funcionaliza a

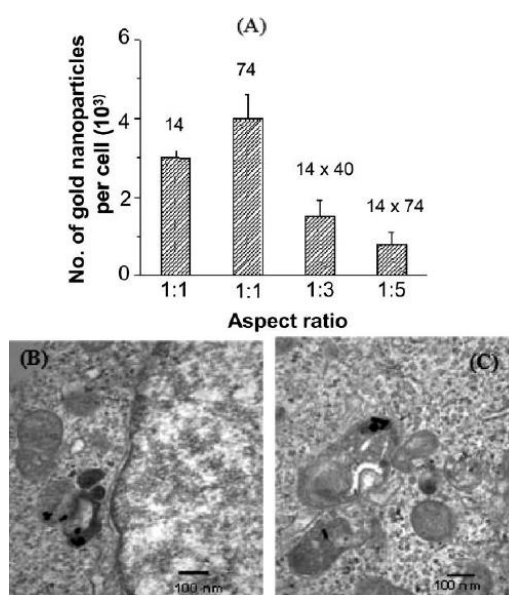
AuNP liga-se a um receptor existente na superfície da célula e entra dentro desta quando a membrana invagina. Eventualmente, o receptor é reciclado, o que implica o seu regresso à superfície da membrana celular, logo que a AuNPs seja libertada pelo receptor dentro da célula. As células têm um máximo de densidade de receptores na superfície da sua membrana plasmática (número de receptores por superfície celular), sendo este número de receptores disponíveis e activos que determinam, não só se uma molécula pode entrar na célula, mas também o mecanismo da sua entrada. Estes investigadores concluíram que as proteínas que estão adsorvidas à superfície das AuNPs de citrato determinam os tempos de semi-vida de internalização das AuNPs nas células e a quantidade de AuNPs que entram nas células (Chithrani *et al.*, 2006).



**Figura 11** – Cinética da entrada das AuNPs nas células HeLa. (A) Internalização das AuNPs em função do tempo de incubação para AuNPs de 3 tamanhos (diâmetro de 14, 50 e 74 nm). (B) Gráficos que relacionam a internalização das AuNPs nas células com a concentração (AuNPs com diâmetros de 14, 50 e 74 nm) (Chithrani, B.D. *et al.*, 2006).

Estes investigadores publicaram no mesmo artigo, os resultados obtidos numa investigação cujo objectivo era verificar se a forma das AuNPs influencia a sua entrada nas células. Com este propósito, utilizaram AuNPs de forma esférica e AuNPs em forma de bastonete (*rods*). A Figura 12 (A) expressa os resultados através de um gráfico de barras mostrando que a internalização das AuNPs é dependente da sua forma, sendo os valores da internalização das AuNPs em bastonete (*rods*) menores do que os valores da internalização das AuNPs esféricas.

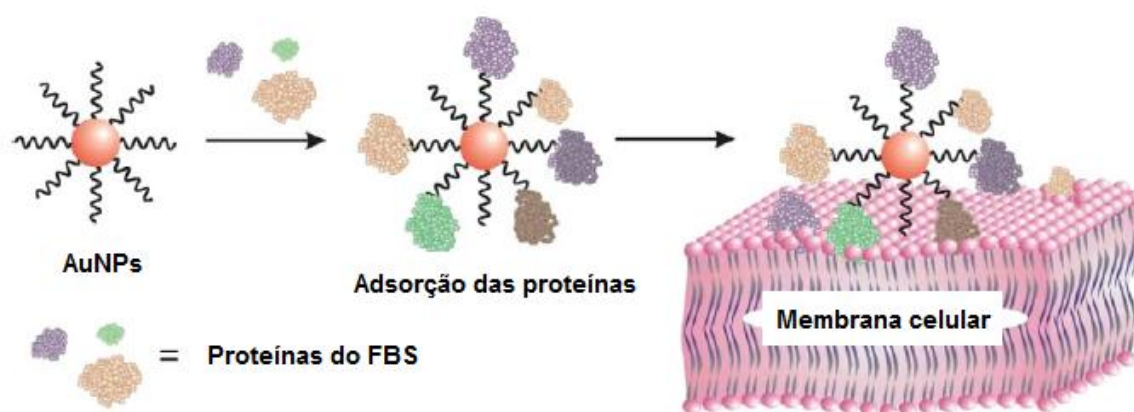
À data da publicação do artigo, 2006, os investigadores apenas podiam especular quanto ao motivo para tais diferenças. Uma explicação avançada pelos investigadores referia que as AuNPs em forma de bastonete teriam uma área de contacto com os receptores da superfície da membrana celular maior que as AuNPs esféricas, quando o eixo longitudinal dos bastonetes interage com o receptor. Este facto pode também limitar estericamente o número de receptores disponíveis para estabelecer ligações com outras AuNPs. Outra razão que pode explicar a menor facilidade de internalização dos *nanorods* nas células relativamente às AuNPs esféricas, prende-se com o facto de, durante a síntese e estabilização dos *nanorods* testados, se utilizar um surfactante, CTAB, que fica adsorvido à sua superfície. O facto de os *nanorods* ficarem revestidos com o CTAB, impede a adsorção eficaz e homogénea das proteínas na sua superfície, dificultando a sua ligação aos receptores da membrana plasmática e conseqüentemente a sua internalização (Chithrani *et al.*, 2006).



**Figura 12** – O efeito da forma das AuNPs na internalização das mesmas. (A) Comparação do número de AuNPs/célula em haste (*rods*) internalizadas pelas células (1:3 e 1:5) com o número de AuNPs/ célula esféricas (1:1). (B) e (C) Imagens TEM de AuNPs em forma de haste (*rods*) ratio 1:3 (B) e 1:5 (C), internalizadas em vesículas de células HeLa (Chithrani, B.D. *et al.*, 2006).

Outra conclusão importante, decorrente desta investigação, relaciona-se com a influência que o revestimento das AuNPs tem na sua internalização pelas células (HeLa). Uma comparação quantitativa entre AuNPs de citrato e AuNPs revestidas de transferrina demonstrou que as primeiras, têm taxas superiores de internalização. Na tentativa de explicar este fenómeno, estes cientistas sugeriram que às AuNPs de citrato se ligariam muitas proteínas do soro, proteínas essas que entram nas células, facilitando, por isso, a entrada destas AuNPs. Já foi provado, por estudos nesta área, que durante uma incubação das células, em condições habituais para estes ensaios, as proteínas existentes no meio de cultura suplementado com FBS, adsorvem às NPs, determinando a sua interacção com a membrana celular (*vide* Figura 13) (Verma e Stellaci, 2010).

À data da publicação destes resultados, só se conheciam dois receptores para a entrada das AuNPs revestidas de transferrina nas células (Chithrani *et al.*, 2006).



**Figura 13** – Proteínas do meio de cultura celular ligam-se às AuNPs funcionalizadas, o que permite que a criação de uma interface entre as AuNPs e a membrana celular e a subsequente internalização das AuNPs nas células (adaptado de Verma e Stellaci, 2010).

Outra ressalva que Chithrani e colaboradores fizeram, no artigo publicado em 2006, refere-se à taxa de saturação dos receptores na internalização das AuNPs. É importante ter em conta que a preparação de soluções de AuNPs em meio de cultura contendo FBS, vai aumentar a concentração de proteínas da solução de AuNPs a que se expõem as células porque, para além das proteínas não ligadas às AuNPs, existem proteínas do FBS adsorvidas na sua superfície. Assim, quando se expõem as células a esta solução, a internalização das AuNPs não está apenas condicionada pela densidade de receptores disponíveis na superfície da célula, mas depende, também, da competição que se estabelece entre o complexo AuNP-proteínas e as proteínas livres do FBS, que têm afinidade para o mesmo receptor. É importante ter em consideração que a adição de FBS

ao meio de cultura celular pode diminuir a entrada das NPs nas células, por um mecanismo de competição na ligação com o receptor da membrana citoplasmática das células (Chithrani *et al.*, 2006).

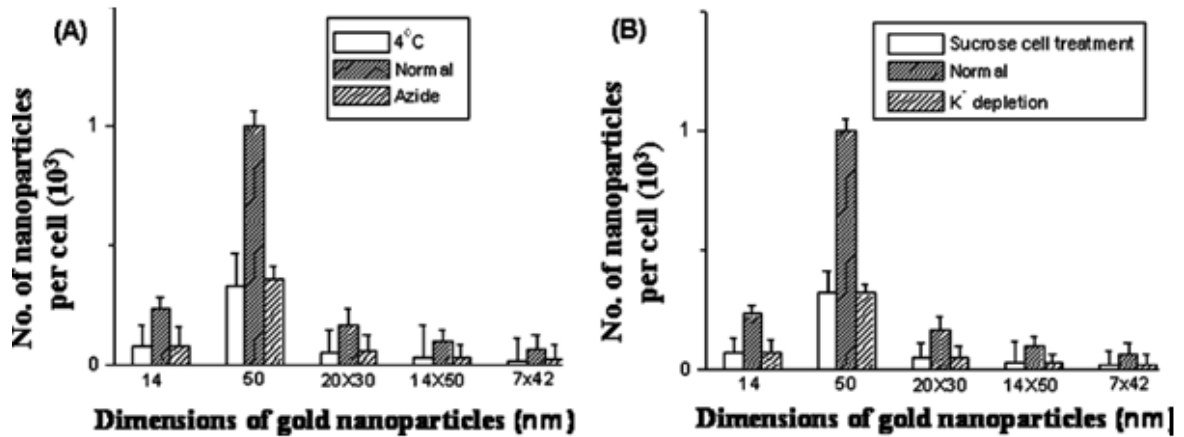
Neste estudo, foi demonstrado que o tamanho e a forma das AuNPs, juntamente com a adsorção não específica de proteínas do FBS, são factores importantes para maximizar a entrada das AuNPs nas células. Aplicando estas novas informações no processo de concepção e síntese de novas AuNPs (AuNPs multifuncionais), será possível desenvolver nanoferramentas, de forma programada e estruturada, para aplicação biomédica (Chithrani *et al.*, 2006).

Na sequência dos estudos previamente referidos, os mesmos investigadores encetaram novos estudos, tendo publicado um artigo em 2007 onde descrevem uma investigação cujo objectivo era compreender o mecanismo de entrada de AuNPs revestidas com transferrina (proteína que transporta o ferro para dentro das células, por um processo endocítico mediado por um receptor) em células de mamíferos. As AuNPs utilizadas tinham diferentes tamanhos e formas (Chithrani e Chan, 2007). Os resultados destes estudos fornecem dados muito importantes sobre as AuNPs testadas. Estes resultados podem ser adaptados a outras investigações, contribuindo para a compreensão da internalização de outras NPs, com formas e tamanhos diferentes, revestidas com outras proteínas. A internalização, exocitose ou acumulação das AuNPs revestidas com transferrina, tanto esféricas como em forma de bastonetes (*rods*), foram cuidadosamente testadas em três linhas celulares diferentes: células CTO (fibroblastos), células HeLa (células cancerígenas do ovário) e células SNB19 (células tumorais cerebrais) (Chithrani e Chan, 2007).

A Figura 14 expressa os resultados em gráficos de barras de um estudo que pretendia demonstrar o mecanismo de internalização de AuNPs esféricas e *nanorods*, revestidas de transferrina. A análise e interpretação dos resultados expressos no gráfico 14 (A) mostram que a entrada de ambas as formas de AuNPs é dependente de um mecanismo endocítico mediado por um receptor. Esta afirmação é sustentada pelo facto de a 4<sup>o</sup> C ou tratadas com azida sódica (meio sem ATP disponível) limita a entrada das AuNPs nas células. A via endocítica só ocorre a 37<sup>o</sup>C e com consumo de energia. Os resultados apresentados no gráfico 14 (B) permitem concluir que a via endocítica de internalização das AuNPs é dependente da clatrina. De facto, o tratamento das células com sacarose (tratamento hipertónico) ou depleção do potássio, não permite a formação de vesículas revestidas por clatrina. Os resultados de internalização foram semelhantes para as AuNPs esféricas e para os *nanorods*, podendo, neste caso, afirmar-se que a internalização de AuNPs revestidas de transferrina, nas células HeLa não depende da



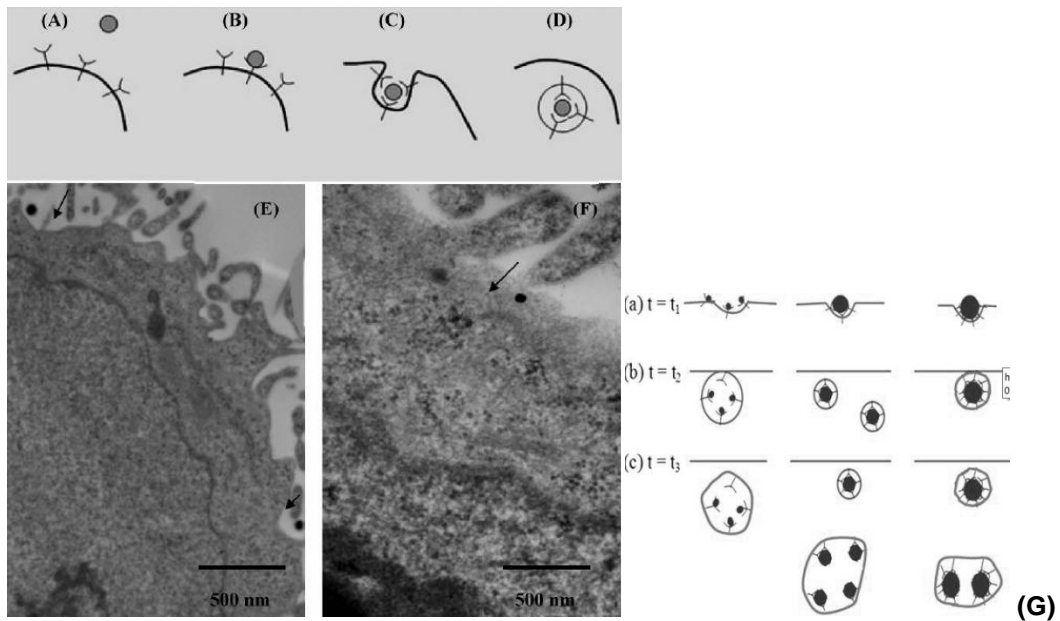
sua forma. Outros mecanismos de internalização seriam, também possíveis, mas não ocorreram em tanta extensão como a endocitose (Chithrani e Chan, 2007).



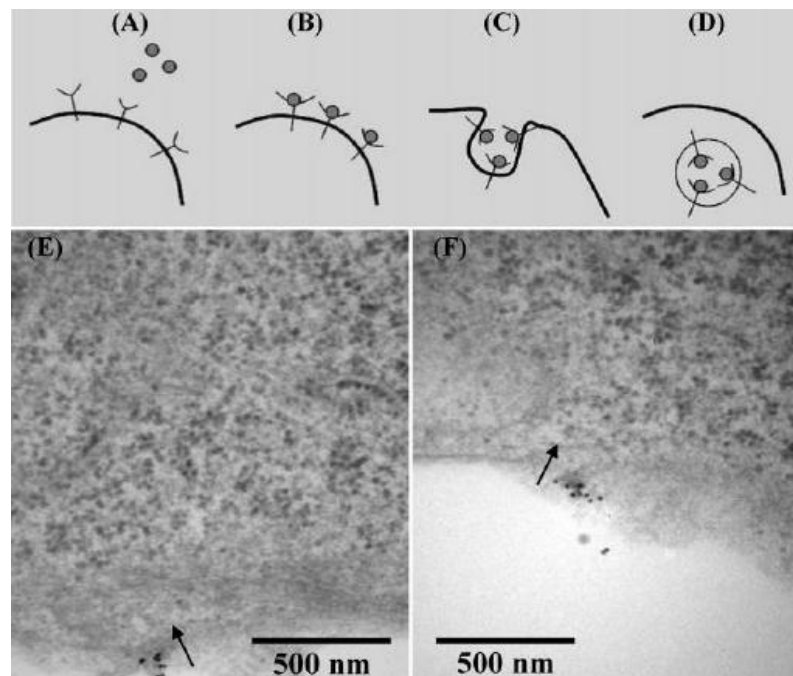
**Figura 14** – Avaliação do mecanismo de entrada das AuNPs esféricas e nanorods com diâmetros de 14, 60, 20x30, 14x60e 7x42 nm, revestidas de transferrina, nas células HeLa. As condições experimentais expressas em (A) e (B) são diferentes, ver legendas (Chithrani e Chan, 2007).

Gao e colaboradores (2005), introduziram um conceito novo de internalização de NPs, o tempo de englobamento (*wrapping time*), relacionado com o modo como a membrana celular engloba as NPs. Estes investigadores sugeriram que o *wrapping time* é dependente do tamanho das partículas, sendo as NPs de, aproximadamente, 55 nm as que apresentam um *wrapping time* mais rápido, tendo também admitido que a interação receptor-ligando pode produzir energia suficiente para conduzir as partículas para o interior das células. Estes cientistas calcularam o *wrapping time* para NPs de vários tamanhos, superiores e inferiores a 55 nm.

Para que as NPs menores, como as de 14 nm, possam ser internalizadas nas células com sucesso, têm que formar agregados. Uma só NP de 50 nm consegue entrar na célula HeLa, enquanto que as NPs de 14 nm, só são englobadas em grupos de 6 (Figuras 15 e 16). Para as NPs maiores (> 50 nm), o *wrapping time* é menor devido à também menor cinética de difusão do receptor (mais receptores estão a ser utilizados, ao mesmo tempo, durante o processo de ligação receptor-ligando, e não ficam logo disponíveis para outra ligação. Este facto leva a que um menor número de NPs seja internalizado (Gao *et al.*, 2005; Chithrani e Chan, 2007).



**Figura 15** – Diferentes estádios do processo de entrada de AuNPs revestidas de transferrina, 50 nm. (A-F) Esquemas alusivos à interacção da NP com a membrana da célula (A), ligação da NP com receptores situados na membrana celular (B), envolvimento da NP pela membrana da célula (C), internalização na célula (D). As Imagens TEM ilustram a endocitose de NPs nas células HeLa [(E) e (F)]. (G) representação esquemática do processo de internalização das AuNPs e do seu destino dentro da célula (Chithrani e Chan, 2007).



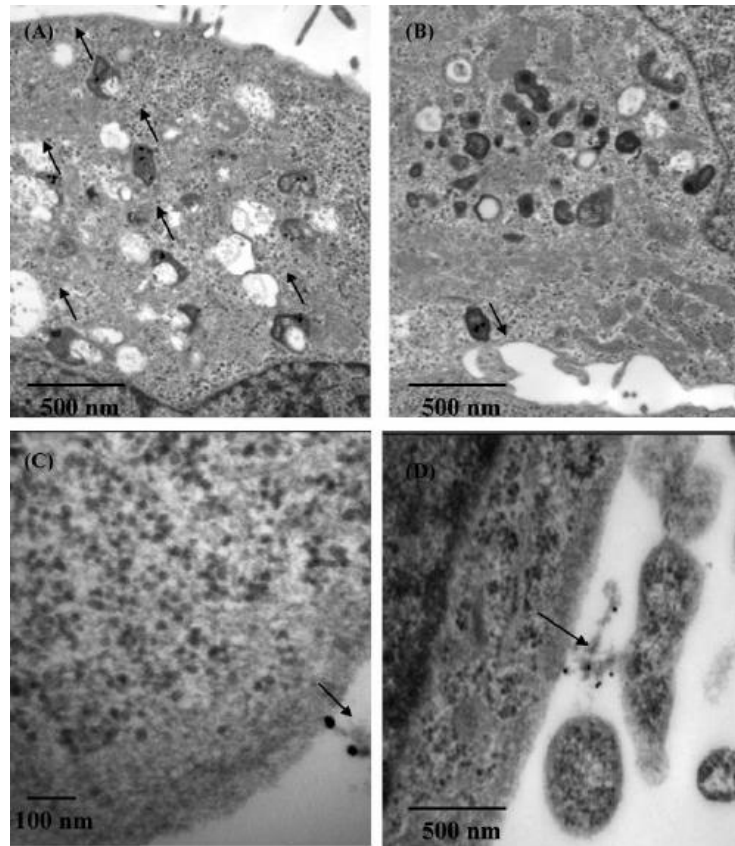
**Figura 16** – Diferentes estádios da internalização de AuNPs revestidas de transferrina, com diâmetro aproximado de 14 nm em células HeLa (A-D). Esquemas alusivos à interacção de NPs com a membrana da célula (A), ligação das NPs aos receptores situados na membrana celular (B), envolvimento das NPs pela membrana (C) e internalização na célula (D). Imagens TEM (E e F) que ilustram a endocitose de NPs nas células HeLa (Chithrani e Chan, 2007).

No que diz respeito ao processo de exocitose das NPs pelas células, pensa-se que a taxa de exocitose das AuNPs de 14 nm é duas vezes maior que a taxa de exocitose das AuNPs de 74 nm e cinco vezes maior que a taxa de exocitose das AuNPs de 100 nm (Chithrani e Chan, 2007).

Os trabalhos de Chithrani e colaboradores, também permitiram concluir que o tempo de remoção das AuNPs das células HeLa é muito menor que o tempo de internalização. Esta investigação permitiu ainda concluir que, tanto a internalização como a exocitose de AuNPs, estão muito dependentes do seu tamanho, mas entram mais rapidamente as NPs de maiores dimensões e saem mais rapidamente as NPs de menores dimensões. Esta tendência verifica-se para as três linhas celulares testadas (células CTO, células HeLa, e células SNB19). Tendo-se verificado que as AuNPs menores saem das células com maior facilidade, embora as suas interações receptor-ligando sejam menores, estes investigadores admitem a hipótese da existência de um mecanismo de exocitose não mediado por receptores para as AuNPs de menor tamanho, que possa justificar a sua facilidade de saída das células (Chithrani e Chan, 2007).

As imagens TEM da Figura 17 ilustram diferentes estádios do processo exocítico de AuNPs de células HeLa. Nestas imagens, os locais com maior contraste (elevada densidade electrónica desse organelos) indicam que as AuNPs parecem estar localizadas em endossomas tardios e lisossomas, antes de serem removidas das células (Chithrani e Chan, 2007).

As AuNPs excretadas das células levam consigo fracções da camada lipídica que constitui a membrana plasmática das células. Estes estudos demonstram que a selecção das NPs a utilizar pode influenciar a concentração de NPs acumuladas bem como as suas taxas de internalização e exocitose. A optimização destes parâmetros conduzirá ao desenvolvimento da área de concepção e diagnóstico, quer na síntese de nanomedicamentos quer na síntese de nanoferramentas, com potencial utilização em diversas aplicações biomédicas (Taraska e Almers, 2004; Chithrani e Chan, 2007).



**Figura 17** – Diferentes estádios do processo de exocitose. (A) Movimento de vesículas contendo AuNPs, em direcção à membrana celular. (B) Chegada de uma das vesículas à membrana da célula HeLa. (C) Excreção de AuNPs. (D) Agregado de AuNPs após a excreção (Chithrani e Chan, 2007).

TABELA 2 – RESUMO DOS RESULTADOS DE TOXICIDADE DAS AuNPs *IN VITRO* (adaptado de Alkilany e Murphy, 2010).

LINHA CELULAR	DIMENSÕES DAS AuNPs (nm)	FORMA DAS AuNPs	REVESTIMENTO SUPERFICIAL DAS AuNPs	CONCENTRAÇÃO <sup>(a)</sup> ; TEMPO DE INCUBAÇÃO	PRINCIPAIS CONCLUSÕES	REFERÊNCIA
Células de mamífero COS-1, glóbulos vermelhos, E.coli	2	Esferas	Composto amónio quaternário, ácido carboxílico	0,38-3 µM; 1-24 h	AuNPs catiónicas são citotóxicas e as AuNPs carregadas negativamente não apresentam toxicidade em igual concentração.  <b>Diferentes linhas celulares mas iguais efeitos tóxicos</b> (MTT, Azul de Tripano)	Goodman <i>et al.</i> , <b>2004</b>
Macrófagos de rato RAW 264,7	3,5±0,7	Esferas	Lisina, poli-lisina, FITC	10-100 µM; 24-72 h	AuNPs não são tóxicas nem imunogénicas (MTT)	Shukla <i>et al.</i> , <b>2005</b>
Células leucémicas humanas K562	4,12,18	Esferas	CTAB, citrato, <b>cisteína</b> , <b>glucose</b> , biotina	0,001-250 µM de Au; 3 dias	Todas as AuNPs, <b>com diferentes tamanhos e diferentes grupos funcionais</b> , são não tóxicas (MTT)	Connor <i>et al.</i> , <b>2005</b>
MV3 e BLM (Melanoma metastático)	1,4	Agregados Esféricos	Monosulfonato de trifenilfosfato	Maiores que 0,4 µM; 72 h	100% de morte celular na concentração de 0,4 µM comparada com 10% de morte celular para a cisplatina (fármaco antineoplásico) na mesma concentração	Tsoli <i>et al.</i> , <b>2005</b>

TABELA 2 – RESUMO DOS RESULTADOS DE TOXICIDADE DAS AuNPs *IN VITRO* (adaptado de Alkilany e Murphy, 2010) – continuação.

LINHA CELULAR	DIMENSÕES DAS AuNPs (nm)	FORMA DAS AuNPs	REVESTIMENTO SUPERFICIAL DAS AuNPs	CONCENTRAÇÃO <sup>(a)</sup> ; TEMPO DE INCUBAÇÃO	PRINCIPAIS CONCLUSÕES	REFERÊNCIA
HeLa	65X11	Hastes ( <i>rods</i> )	CTAB, PEG	0,09-1,45 $\mu$ M; 24 h	Substituição de CTAB por PEG na superfície dos bastonetes ( <i>nanorods</i> ) reduz a sua toxicidade	Takahashi <i>et al.</i> , <b>2006</b>
Fibroblastos dérmicos humanos	13,1	Esferas	Citrato	0-4 mM; 24-144 h	AuNPs diminuem a taxa de proliferação, adesão e motilidade celular, as células ficam preenchidas de vacúolos (observado por microscopia)  Não foram conduzidos testes de citotoxicidade mas a diminuição do nº de células indica algum efeito tóxico	Pernodet <i>et al.</i> , <b>2006</b>
HeLa	40X18	Bastonetes ( <i>rods</i> )	CTAB, PSS, PDADMAC	10-150 $\mu$ M; 6 h	Revestimento polielectrólito dos <i>nanorods</i> não é tóxico quando comparado com os <i>nanorods</i> revestidos com CTAB; ausência de anormalidades na expressão genética	Hauck <i>et al.</i> , <b>2008</b>

TABELA 2 – RESUMO DOS RESULTADOS DE TOXICIDADE DAS AuNPs *IN VITRO* (adaptado de Alkilany e Murphy, 2010) – continuação.

LINHA CELULAR	DIMENSÕES DAS AuNPs (nm)	FORMA DAS AuNPs	REVESTIMENTO SUPERFICIAL DAS AuNPs	CONCENTRAÇÃO <sup>(a)</sup> ; TEMPO DE INCUBAÇÃO	PRINCIPAIS CONCLUSÕES	REFERÊNCIA
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Células de rim de hamster bebé (BHK21)</li> <li>• Células de hepatoma humano (HepG2)</li> <li>• Células de carcinoma pulmonar humano (A549)</li> </ul>	33	Esferas	CTAB e citrato	0-120 nM; 36 h para A549 e 72 h para HepG2 e BHK21	AuNPs não são tóxicas para as células HepG2 e BHK21 mas são tóxicas para as células A549	Patra <i>et al.</i> , <b>2007</b>
HeLa	18	Esferas	Citrato	0,2 – 2 nM; 3 – 6 h	AuNPs não são tóxicas e não provocam alterações nos padrões de expressão genética	Khan <i>et al.</i> , <b>2007</b>
Células dendríticas C57BL/6 do rato	10	Esferas	Citrato	0,5 mM; 4-48 h	AuNPs não são tóxicas e não induzem a activação das células dendríticas	Villiers <i>et al.</i> , <b>2009</b>

TABELA 2 – RESUMO DOS RESULTADOS DE TOXICIDADE DAS AuNPs *IN VITRO* (adaptado de Alkilany e Murphy, 2010) – continuação.

LINHA CELULAR	DIMENSÕES DAS AuNPs (nm)	FORMA DAS AuNPs	REVESTIMENTO SUPERFICIAL DAS AuNPs	CONCENTRAÇÃO <sup>(a)</sup> ; TEMPO DE INCUBAÇÃO	PRINCIPAIS CONCLUSÕES	REFERÊNCIA
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Epitelial: HeLa</li> <li>• Endotelial: SK-Mel-28</li> <li>• Fibroblastos: L929</li> <li>• Fagócitos: j774A1</li> </ul>	0,8 1,2 1,4 1,8 15	Esferas	Mono e trifosfonato de trifetilfosfato	Superiores a 5,6 µM; 72 h	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1,4 nm - tamanho com maior toxicidade</li> <li>• 0,8 nm; 1,2 nm e 1,8 nm – menos tóxicas</li> <li>• 15 nm – completamente não tóxicas</li> <li>• A toxicidade não depende só da linha celular mas também do tamanho das partículas</li> </ul>	Pan <i>et al.</i> , 2007
Células epiteliais cancerígenas do cérvix HeLa	1,4 e 15	Esferas	Monosulfonato de Trifenilfosfato (TPMS), GSH	5,6 mM; 48 h	<ul style="list-style-type: none"> <li>• AuNPs de 1,4 nm induzem necrose por <i>stress</i> oxidativo</li> <li>• AuNPs de 15 nm não são citotóxicas</li> <li>• GSH AuNPs são menos tóxicas que as TPMS AuNPs</li> </ul>	Pan <i>et al.</i> , 2009



TABELA 2 – RESUMO DOS RESULTADOS DE TOXICIDADE DAS AuNPs *IN VITRO* (adaptado de Lewinski *et al.*, 2008) – continuação.

LINHA CELULAR	DIMENSÕES DAS AuNPs (nm)	FORMA DAS AuNPs	REVESTIMENTO SUPERFICIAL DAS AuNPs	CONCENTRAÇÃO <sup>(a)</sup> ; TEMPO DE INCUBAÇÃO	PRINCIPAIS CONCLUSÕES	REFERÊNCIA
HeLa	3,7 nm	Esferas	PEG	0,08-100 µM; 6-72 h	AuNPs entram no núcleo e não induzem citotoxicidade	Gu <i>et al.</i> , <b>2009</b>
Células de carcinoma humano do cólon (HT-29)	65X15 nm	Bastonetes (rods)	CTAB, PAA, PAH	0,6 nM; 96 h	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Os <i>nanorods</i> não são citotóxicos</li> <li>• O excesso de CTAB é tóxico</li> <li>• Se revestirmos os nanorods já revestidos com CTAB com polímeros quer carregados negativa quer positivamente reduzimos a toxicidade e afectamos a sua internalização nas células</li> </ul>	Alkilany <i>et al.</i> , <b>2009</b>
COS-7 (linha celular de rim de macaco)		Esferas	PEI2 (polietilenoimina)	6 e 42 h	70-80% de viabilidade após transfecção (MTT)	Thomas <i>et al.</i> , <b>2003</b>
HepG2 (Hepatoma humano)	20-25 nm	Esferas	BSA, quatro péptidos com um alvo específico	12 h	AuNPs não tóxicas	Tkachenko <i>et al.</i> , <b>2003</b>

TABELA 2 – RESUMO DOS RESULTADOS DE TOXICIDADE DAS AuNPs *IN VITRO* (adaptado de Lewinski *et al.*, 2008) – continuação.

LINHA CELULAR	DIMENSÕES DAS AuNPs (nm)	FORMA DAS AuNPs	REVESTIMENTO SUPERFICIAL DAS AuNPs	CONCENTRAÇÃO <sup>(a)</sup> ; TEMPO DE INCUBAÇÃO	PRINCIPAIS CONCLUSÕES	REFERÊNCIA
HeLa, 3T3/NIH, HepG2	22 nm	Esferas	BSA, quatro péptidos com um alvo específico	150 pM 3 h	Viabilidade celular reduzida em 20% nas células HeLa, mas só 5% nas células 3T3/NIH (LDH)	Tkachenko <i>et al.</i> , 2004
Células de tumor mamário humano (MDA-MB-231)	10 nm	Esferas	Cumarina-PEG-tiol Metoxi-PEG-tiol (controlo negativo)	50-200 µg/mL	AuNPs são internalizadas mas não tóxicas até 200 µg/mL ( <i>Cell Titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay</i> , que é uma variação do ensaio MTT)	Fu <i>et al.</i> , 2005 Shenoy <i>et al.</i> , 2006

**CTAB** – brometo de cetiltrimetilamónio (surfactante catiónico); **PEG** – polietilenoglicol (revestimento inerte); **PSS** – poli- 4- estirenosulfonato de sódio (polielectrólito aniónico); **PDADMAC** – poli- clorido de dialildimetilamónio (polielectrólito catiónico); **PAA** – poli- (ácido acrílico, sal sódico) (polielectrólito aniónico); **PAH** – poli- hidróclorido de alilamina (polielectrólito catiónico); **GSH** – glutatona reduzida.

(a) Doses estão descritas nos artigos originais e são expressas em concentrações de ouro coloidal.

## ***II - Trabalho Experimental***



## II - Trabalho Experimental

### 1. Objectivos

O enorme potencial das AuNPs está relacionado com as suas aplicações biomédicas, não apenas como agentes terapêuticos, como vectores de transporte e cedência de fármacos, mas também como agentes de imagiologia e diagnóstico, como ferramentas úteis para descodificar mecanismos celulares, marcadores celulares, vectores para transfecção celular e sensores celulares (Liu *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2008; Yen *et al.*, 2009). Nesta perspectiva, a síntese de AuNPs e a sua funcionalização com diferentes moléculas têm sido desenvolvidas por muitos grupos de investigação (Sun *et al.*, 2008).

No entanto, apesar dos benefícios das suas inúmeras aplicações em biomedicina, coexiste a possibilidade das AuNPs serem tóxicas para as células e para o organismo humano, o que torna imprescindível realizar estudos que testem a sua biocompatibilidade (Yen *et al.*, 2009).

Actualmente, embora ainda não se compreenda totalmente a interacção das NPs com as células, sabe-se que as AuNPs se ligam com facilidade a grupos amina e tióis, razão pela qual podem interferir com o DNA (Gearheart *et al.*, 2001) e com aminoácidos (Selvakannan *et al.*, 2004). Assim, estas NPs podem possuir efeitos adversos a nível celular, por interagirem com componentes celulares vitais, tais como a membrana citoplasmática, as mitocôndrias ou o núcleo. Os seus efeitos tóxicos podem incluir dano nos organelos ou DNA, *stress* oxidativo, apoptose, mutagénese e regulação positiva ou negativa da síntese de determinadas proteínas (Unfried *et al.*, 2007; Aillon *et al.*, 2009; Jia *et al.*, 2009; Pan *et al.*, 2009; Alkilany e Murphy, 2010).

Partindo destes pressupostos, os ensaios experimentais realizados no âmbito desta dissertação tiveram os seguintes objectivos principais:

- Avaliar a citotoxicidade das AuNPs testadas [AuNPs revestidas de citrato, AuNPs revestidas com ácido 11-mercaptoundecanóico (MUA), AuNPs revestidas de pentapéptidos (CALND e CALNS), numa linha celular de hepatoma humano HepG2;
- Avaliar a citotoxicidade dos meios de dispersão das NPs (veículos) nas células HepG2;
- Avaliar a influência dos diferentes revestimentos na capacidade de internalização das AuNPs testadas nas células HepG2.

## 2. Materiais Utilizados

### 2.1. Reagentes para cultura celular, ensaios de citotoxicidade e de internalização

Todos os reagentes e solventes utilizados tinham elevado grau de pureza e foram empregues sem recurso a qualquer tipo de purificação adicional.

Para crescimento das células HepG2 foi escolhido o meio de cultura MEM- $\alpha$  (*Minimum Essential Medium Alpha*), que contém L-glutamina mas não tem na sua constituição ribonucleosidos nem desoxirribonucleosidos, adquirido ao laboratório Gibco (Invitrogen™, Paisley, Grand Island New York, USA).

Para a cultura das células HepG2, o meio MEM- $\alpha$  foi suplementado com uma mistura de solução de antibiótico (Pen Strep®, penicilina/estreptomicina da Gibco, Invitrogen™), uma solução de antifúngico (Fungizone®, anfotericina B da Gibco, Invitrogen™), uma solução de soro bovino fetal, inactivado pelo calor (FBS, *fetal bovine serum heat inactivated* da Gibco, Invitrogen™) e transferrina também adquirida na Gibco (Invitrogen™). Depois de preparado, este meio suplementado quando armazenado no frigorífico a 4° C tem validade de 3 meses, aproximadamente.

Outro reagente necessário à realização do trabalho laboratorial foi a solução salina HBSS (*Hanks Balanced Salt Solution*). O HBSS, com cloreto de cálcio e magnésio (HBSS ++), e o HBSS sem estes sais (HBSS --), foi fornecido pela Gibco, Invitrogen™. Esta solução foi armazenada, como recomendado, ao abrigo da luz e à temperatura ambiente.

Para destacar as células dos frascos de cultura celular e das placas de 96 poços foi utilizada tripsina (0,25%), que contém EDTA.4Na em HBSS sem CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O e MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O. Esta tripsina tem como indicador o vermelho de fenol e deve ser armazenada a -20 °C. A tripsina foi adquirida à Gibco (Invitrogen™).

O brometo de 3- (4,5- dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio (MTT), é um pó amarelo, armazenado a -4° C. Foi utilizado para a realização do ensaio de viabilidade celular, designado por ensaio de redução do MTT. Este reagente foi adquirido à Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

O dimetilsulfóxido (DMSO), utilizado no ensaio de redução do MTT, foi adquirido à Merck (Darmstadt, Alemanha).

Para a realização do ensaio de libertação da enzima lactato desidrogenase (LDH), ensaio de viabilidade celular, foi necessário adquirir os seguintes reagentes: piruvato, cofactor  $\beta$ -NADH, triton X-100, todos adquiridos à Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). O tampão de LDH (tampão fosfato), também necessário à realização deste ensaio, foi

preparado na concentração de 0,1 M, com  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , ambos os reagentes adquiridos à Merck.

Na determinação quantitativa da proteína nos ensaios de internalização das AuNPs, foi usado um kit fornecido pelo laboratório BioRad.

Para a preparação dos padrões de Au, necessários para a quantificação por Espectrofotometria de Absorção Atómica com Atomização Electrotérmica (EAA/AE), foi utilizado o ácido tetracloroáurico ( $\text{HAuCl}_4$ ). Todo o material utilizado nesta técnica de quantificação do Au foi lavado, previamente, com  $\text{HNO}_3$ .

As AuNPs revestidas com citrato, MUA, CALND e CALNS, utilizadas nesta investigação, foram sintetizadas no Departamento de Química Inorgânica da Faculdade de Ciências do Porto (*vide* secção 4).

As placas de cultura de 96 poços foram adquiridas à Corning® Costar® (Corning, NY, EUA) e os frascos de 25 e 75  $\text{cm}^3$  à TPP® (Trasadingen, Suíça).

Todos os outros reagentes foram adquiridos à Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, EUA) ou à Merck (Darmstadt, Alemanha), salvo qualquer excepção que é devidamente referenciada.

## **2.2. Instrumentos para cultura celular, ensaios de citotoxicidade e de internalização**

As pesagens dos compostos utilizados nos ensaios experimentais, realizados no âmbito desta dissertação, foram efectuadas com balança digital (0,02-420 g) KERN<sub>EG</sub> e balança analítica de precisão (1 mg-220 g) METTLER TOLEDO AB 265-S do Departamento de Toxicologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

As imagens de Microscopia de Transmissão Electrónica (TEM), para determinação qualitativa do Au internalizado nas células HepG2, foram obtidas com o Microscópio TEM (Hitachi H9000-Na) do Departamento de Bioquímica da Faculdade de Desporto da Universidade do Porto.

As determinações quantitativas de Au, nos ensaios de internalização das AuNPs nas células HepG2, foram efectuadas com o Espectrofotómetro de Absorção Atómica, com atomização electrotérmica (EAA/AE), da marca Analyst 600 (PerkinElmer), do Departamento de Toxicologia, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

Para visualização das células HepG2, tanto nos frascos como nas placas de poços, utilizou-se o Microscópio de Fundo Invertido Nikon Eclipse TS 100. Este microscópio tem acoplada uma máquina fotográfica que permitiu fotografar as células HepG2 após incubação com os diferentes tipos de AuNPs.

A contagem das células na Câmara de Neubauer fez-se com um Microscópio Óptico Nikon Type 119. O trabalho de cultura celular foi executado numa Câmara de Fluxo Laminar Vertical HERA Safe, da marca Heraeus, e as células e placas de poços mantiveram-se em crescimento numa estufa (Binder CB 150 # 03-58010) a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>.

Para aquecer os reagentes de cultura celular utilizou-se o banho de água (BW-05 G Lab.Companion) e as centrifugações foram feitas numa centrífuga da marca Eppendorf, modelo 5810 R.

Todo o material de plástico utilizado na cultura celular era estéril ou foi previamente esterilizado por calor húmido, a 121°C durante 15 minutos, num autoclave da marca Uniclave 88, e a sua secagem foi efectuada numa estufa Heraeus. O material de vidro foi esterilizado numa estufa Heraeus, a 180 °C (calor seco), durante uma hora.

As AuNPs foram sonicadas num sonicador da marca Bandelin Sonorex RK100H. Para proceder à leitura da absorvência nos ensaios espectrofotométricos utilizou-se um leitor de placas da marca PowerWavex, BIO-TEK instruments, inc.

Todo o equipamento mencionado pertence ao Departamento de Toxicologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

### **3. Linha Celular de Hepatoma Humano (HepG2)**

A linha celular utilizada nestes ensaios experimentais, cedida pelo Centro de Toxicologia da *School of Pharmacy, University of London*, é cancerígena, obtida originalmente, em 1975, do fígado de um indivíduo caucasiano de sexo masculino, com 15 anos de idade. A opção por esta linha celular baseou-se no facto deste modelo celular ser reportado como específico para a detecção de vários marcadores de hepatotoxicidade *in vitro*. Apesar das suas limitações metabólicas, é defendido que os estudos de citotoxicidade nas células HepG2 podem prever a hepatotoxicidade *in vivo* com 80% de sensibilidade e 90% de especificidade (O'Brien *et al.*, 2006; Noor *et al.*, 2009). A sua fácil manutenção em cultura, a sua estabilidade e o facto de serem específicas de um órgão humano, o fígado, explica as vantagens da aplicação das HepG2 em ensaios *in vitro*, não obstante as limitações do seu metabolismo.

Outros pontos de referência muito importantes na escolha desta linha celular para os ensaios comparativos de citotoxicidade e internalização dos diferentes tipos de AuNPs, referidos na presente dissertação, foram os resultados expressos em estudos descritos na literatura da especialidade, que reconhecem o fígado como órgão alvo da toxicidade das NPs, devido ao seu elevado potencial de acumulação, após a sua introdução no



organismo por via intravenosa em ratos (Ogawara *et al.*, 1999), e sendo um segundo órgão alvo de localização, depois da exposição pulmonar a estes materiais em humanos (Nemmar *et al.*, 2002) e em ratos (Oberdörster *et al.*, 2002). As células HepG2 são consideradas um dos modelos mais realísticos e relevantes para o estudo do comportamento dos hepatócitos *in vitro*, possibilitando uma recolha válida de informações para desenvolver futuros estudos *in vivo*. Desde que se coloca a questão de uma determinada NP ser tóxica para o ser humano, as células humanas são a melhor escolha para prever a citotoxicidade no Homem (Lewinski *et al.*, 2008).

É evidente que os hepatócitos humanos, obtidos por isolamento primário, poderiam ser utilizados como modelo destes ensaios de citotoxicidade, mas têm a desvantagem de poderem apresentar polimorfismos genéticos, o que pode dificultar a reprodutibilidade dos resultados e a sua interpretação. Para além desta desvantagem, é de assinalar o facto de, nas linhas celulares primárias, as células sofrerem *stress*, devido aos processos de isolamento, o que pode afectar os resultados obtidos (Stone *et al.*, 2009).

Também poderiam ser utilizados hepatócitos de rato, contudo existem diferenças entre os hepatócitos das diferentes espécies no que diz respeito à sensibilidade aos xenobióticos, na indução de enzimas metabólicas e no metabolismo, traduzindo-se estas diferenças numa má concordância entre a hepatotoxicidade entre animais e humanos (Noor *et al.*, 2009; Kawata *et al.*, 2009).

Apresentadas as razões da escolha da linha celular HepG2 para a realização dos ensaios experimentais desenvolvidos neste estudo, descrevem-se, de seguida, os procedimentos inerentes à sua cultura e preparação das placas de poços onde as células são semeadas e posteriormente expostas às AuNPs, cuja citotoxicidade e capacidade de internalização se pretende avaliar.

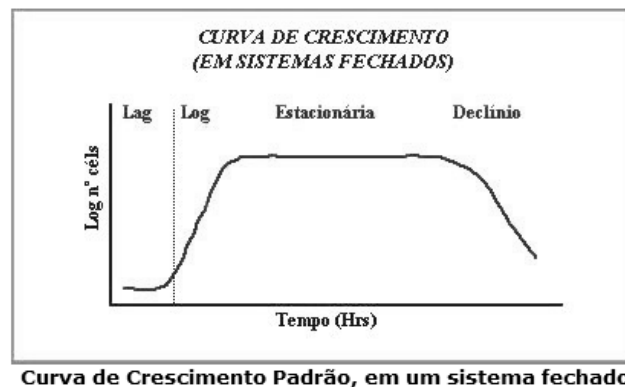
A linha celular HepG2 cresceu até à confluência em meio de cultura MEM- $\alpha$  suplementado com 10% soro bovino fetal (FBS), 1% mistura de penicilina/estreptomicina (Pen Strep®), 1% de anfotericina B (Fungizone®), 750  $\mu$ L de transferrina e foi mantida à temperatura de 37 °C numa atmosfera com 5% CO<sub>2</sub> e 95% de humidade. O crescimento das células HepG2 foi realizado de acordo com as instruções ATCC (<http://www.lgcpromochem.com/atcc/>) em frascos de cultura T25 cm<sup>2</sup> e T75 cm<sup>2</sup> (Ponti *et al.*, 2006; Johnston *et al.*, 2009).

As células foram mantidas em fase de crescimento exponencial (logarítmico, Log) durante o tempo de execução do trabalho experimental.

Após a confluência, as células foram tripsinizadas (concentração de tripsina de 0,25%) e subcultivadas em placas de 96 poços, à densidade de 150 000 células/200 $\mu$ L de meio (densidade celular de 750 000 células/mL). A contagem das células foi efectuada em

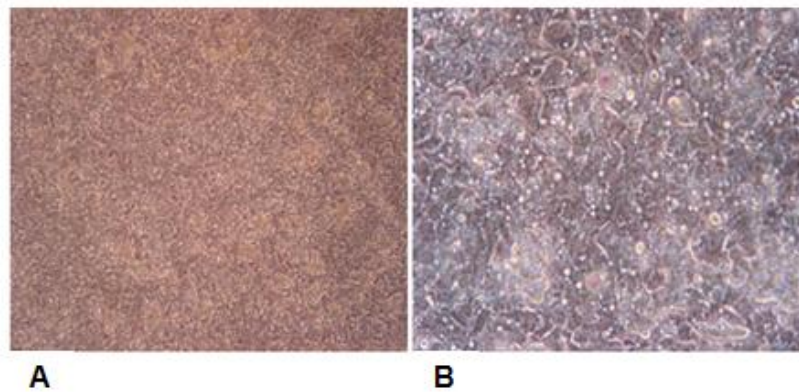
câmara de Neubauer e, para avaliar a viabilidade das células, utilizou-se a técnica de exclusão do Azul de Tripano. O Azul de Tripano é um corante que só penetra nas células cuja integridade membranar está comprometida. Deste modo, as células mortas ficam coradas de azul e as células vivas mantêm a sua cor normal. A contagem das células vivas e mortas foi efectuada utilizando uma câmara de Neubauer e um microscópio óptico com a objectiva de ampliação de 10 X (Johnston *et al.*, 2009; Lewinski *et al.*, 2008).

As células HepG2 utilizadas nos ensaios laboratoriais não ultrapassaram as dez passagens consecutivas, descongelando-se inicialmente as células na passagem celular P-129. Estas células apresentam um crescimento em monocamada, aderente aos frascos e placas de cultura celular. Aquando da passagem para subcultura celular, a diluição celular deve ser elevada para permitir um aporte de nutrientes suficiente para retomar o crescimento logarítmico. Se o meio de cultura é repostado, sem diminuição da densidade celular, verifica-se a depleção das substâncias essenciais para as células e estas morrem. No entanto, se as células são diluídas abaixo da densidade mínima, entram em fase de crescimento Lag e crescem muito lentamente ou morrem (Figura 18).



**Figura 18** – Esquema representativo da curva de crescimento padrão de células num sistema fechado (adaptado de Madigan *et al.*, Brock Biology of Microorganisms, 2003).

Para as células HepG2 a diluição para subcultura recomendada é de 1:4, efectuada a cada 3-6 dias e renovação de meio de cultura duas vezes por semana (<http://www.lgcpromochem.com/atcc/>). Após 3 dias de incubação e 5% de CO<sub>2</sub>, obtiveram-se placas de 96 poços com células confluentes, sendo então incubadas com as AuNPs. Na Figura 19, apresentam-se duas fotografias de células HepG2 com diferentes ampliações que cresceram até à confluência em frascos T75 cm<sup>2</sup>.



**Figura 19** – Fotografias das células HepG2 que cresceram até à confluência num frasco T75 cm<sup>2</sup> (fotografias obtidas com a câmara acoplada ao microscópio de fundo invertido Nikon Eclipse TS 100). **A** – 10x; **B** – 40x (células na passagem 130).

Para cada um dos trabalhos experimentais descritos nesta dissertação, realizaram-se, pelo menos, três experiências independentes (n=3), em triplicado, sendo todas as condições testadas em cada uma das experiências.

#### 4. Método de Síntese das AuNPs

As AuNPs utilizadas nesta investigação, com o objectivo de avaliar a sua citotoxicidade e internalização, foram sintetizadas e funcionalizadas no Departamento de Química Inorgânica da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto. A sua síntese, e posterior adição dos revestimentos, ocorreram em ambiente estéril. Foram fornecidas numa solução coloidal com concentração 526  $\mu\text{M}$  em Au (Figura 20) e mantiveram-se em condições de esterilidade durante os procedimentos que envolveram o crescimento da linha celular de hepatoma humano HepG2. Antes de se executarem os ensaios *in vitro*, as AuNPs foram caracterizadas no veículo em que estavam dispersas e no meio de cultura completo das células HepG2 (*vide* Capítulo II, 5).

O cálculo da concentração total de AuNPs na solução coloidal foi determinado atendendo ao valor da absorvência correspondente à banda de ressonância plasmónica do metal (Au) e ao coeficiente de extinção molar ( $\epsilon$ ) por espectrofotometria de UV/Vis. A quantidade de agente de revestimento (MUA ou péptidos), para funcionalizar a superfície de cada AuNP, foi determinada, segundo uma razão molar do agente de revestimento/NP de 120 (Liu *et al.*, 2007; Soares, 2009).

O método utilizado na síntese das AuNPs foi o da redução pelo citrato, inicialmente descrito por Turkvich e colaboradores em 1951 (Turkvich *et al.*, 1951; Soares, 2009). Na

perspectiva de melhorar a eficácia, a reprodutibilidade e a capacidade de controlo deste método, vários estudos foram desenvolvidos no sentido de manter as características físico-químicas (tamanho, forma, dispersão) das AuNPs (Kimling *et al.*, 2006).

Como se pode observar na Figura 20, a solução coloidal de AuNPs de citrato tem um aspecto homogéneo e uma cor vermelho rubi.

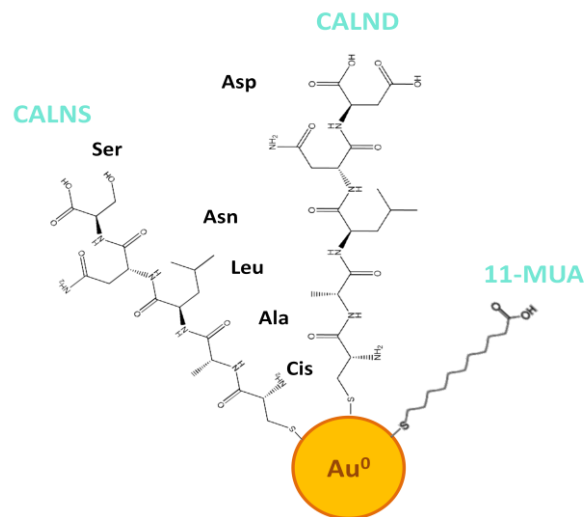
Embora se conheçam outros métodos de síntese de AuNPs, a escolha do método de redução pelo citrato reside no facto deste ser fácil, rápido, reprodutível e, ainda, por se obterem AuNPs esféricas, com baixa dispersão, bastante estáveis, com diâmetros compreendidos entre os 10-20 nm e facilmente funcionalizáveis com diversos ligandos orgânicos (Soares, 2009; Kamat, 2002).



**Figura 20** – Imagem de uma amostra da solução coloidal de AuNPs resultante da síntese pelo método de redução pelo citrato (Soares, 2009).

Para a funcionalização das AuNPs de citrato (AuNPs de referência), foram utilizados os seguintes compostos: MUA e os pentapéptidos CALND e CALNS, sintetizados e cedidos ao Departamento de Química Inorgânica da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto pelo Grupo de Investigação em Química Orgânica da mesma faculdade (Figura 21).

O processo de funcionalização das AuNPs baseou-se na alteração da superfície da NP metálica. Essa alteração ocorre pela troca do agente de revestimento, neste caso particular o citrato, por compostos que contêm elementos com grande afinidade para os metais, os compostos da Tabela 3. Este processo de funcionalização das AuNPs foi baseado em trabalhos de investigação desenvolvidos por equipas como as de Guerrero e Lin e respectivos colaboradores (Guerrero *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2004; Soares, 2009).



**Figura 21** – Esquema representativo da funcionalização de uma AuNP com moléculas com ligação – SH na sua extremidade.

Na Tabela 3, estão representadas as estruturas químicas de cada um dos compostos orgânicos utilizados como agentes de revestimento das AuNPs utilizadas neste estudo.

**Tabela 3** – Fórmulas químicas das estruturas dos agentes de funcionalização das AuNPs (adaptado de Soares, 2009).

Molécula Orgânica	Fórmula de estrutura
11-MUA	
CALND	
CALNS	

## 5. Caracterização das AuNPs revestidas com citrato, MUA, CALND e CALNS

Antes de se iniciarem os ensaios de citotoxicidade com as AuNPs funcionalizadas, avaliou-se a sua estabilidade, estado de agregação e características físico-químicas, quando dispersas no meio de cultura MEM- $\alpha$  completo (meio com todos os suplementos). Concluiu-se que o meio de cultura MEM- $\alpha$  suplementado não influenciou a dinâmica das AuNPs no veículo, nem as características físico-químicas das AuNPs sintetizadas pelos investigadores do Departamento de Química Inorgânica da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

As diferentes soluções diluídas, de todos os tipos de AuNPs testadas, prepararam-se em meio suplementado com FBS. Existem dados na literatura que suportam a ideia que a monodispersão das AuNPs é favorecida pela presença de proteínas no meio de cultura celular e o ensaio *in vitro*, nestas condições, mimetiza de forma mais fiel a situação *in vivo*. Qualquer xenobiótico introduzido no organismo contacta imediatamente com inúmeras proteínas (Stone *et al.*, 2009).

A presença de antibióticos e antifúngico no meio de cultura celular, utilizado para preparar as soluções de AuNPs para incubar as células, justifica-se pelo facto dos testes de citotoxicidade decorrerem durante 96 horas, evitando, deste modo, contaminações das células por bactérias e fungos.

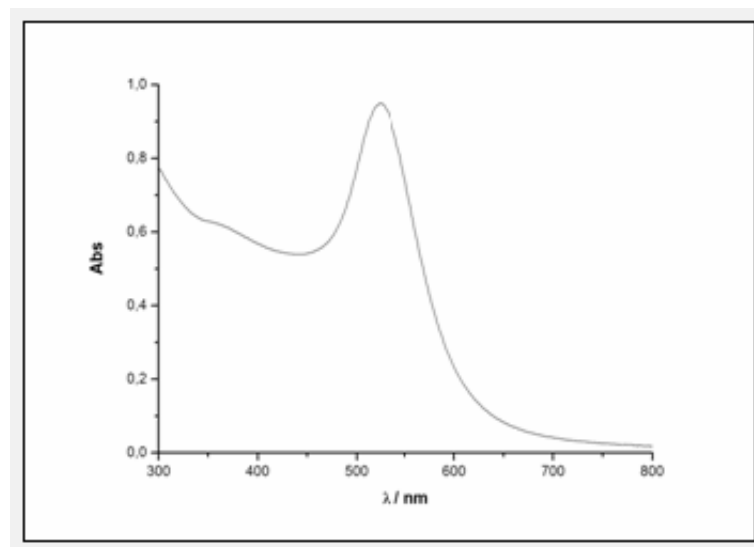
Procedeu-se a um ensaio de estabilidade das soluções concentradas de AuNPs, no que diz respeito ao seu acondicionamento, enquanto se aguardava a sua utilização. O acondicionamento mais indicado para as soluções concentradas AuNPs revelou-se ser em frascos de vidro. Esta opção foi tomada pelo facto de se verificar, comparativamente ao acondicionamento em frascos de plástico, a não alteração da dispersão das AuNPs. Com efeito, as soluções concentradas de AuNPs, em frascos de vidro, mantinham a sua cor típica (vermelho rubi), enquanto que, quando acondicionadas em frascos de plástico, a cor alterava para roxo, o que indica aglomeração das AuNPs. Sabendo que a aglomeração das AuNPs nas soluções concentradas compromete a preparação de soluções diluídas a partir das soluções iniciais, foi executada a preparação em simultâneo de soluções diluídas a partir de soluções concentradas acondicionadas em vidro e em plástico. Medindo o Au coloidal, por EAA/AE, em ambas as séries de soluções diluídas, verificou-se que a obtenção de boas diluições era conseguida quando as soluções concentradas eram acondicionadas em frascos de vidro.

É necessário garantir que, em todos os ensaios, se utilizam AuNPs com as mesmas características, mesmo que sejam provenientes de lotes de síntese diferentes. Um

procedimento imprescindível para que se efectue, de modo assertivo e estruturado, um estudo de avaliação da citotoxicidade de uma NP é a sua prévia caracterização.

Deste modo, sempre que efectuada a síntese de um novo lote de AuNPs de citrato, revestidas pelo MUA ou pelos pentapéptidos CALND e CALNS, foram realizados os seguintes testes de caracterização: espectro de absorção de UV/Vis, imagem de TEM, medições de *Dynamic Light Scattering* (DLS, Dispersão dinâmica de luz), e potencial zeta ( $\zeta$ ) (Soares, 2009).

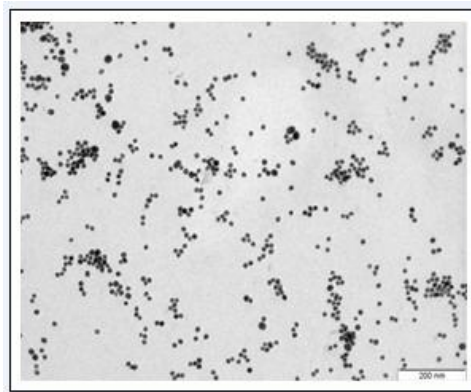
A caracterização das AuNPs de citrato por espectrofotometria de UV/Vis, Figura 22, apresenta a banda plasmónica de ressonância superficial, centrada por volta dos 520 nm, a pH 6. Este comprimento de onda está relacionado com a forma das NPs, com a distância inter-partículas e é sensível ao seu tamanho e ao índice de refração do meio. Este resultado indica-nos que se trata de uma amostra com dispersão de tamanhos bastante reduzida e bem estabilizada pelo agente de revestimento (citrato) (Soares, 2009).



**Figura 22** – Espectro de UV/Vis das AuNPs de citrato: Banda plasmónica bem definida, centrada a 520 nm, característica de AuNPs esféricas. As AuNPs apresentam monodispersão (cedida por Soares, 2010, Departamento de Química Inorgânica, FCUP).

A caracterização das AuNPs de citrato por TEM, Figura 23, confirma as características obtidas por UV/Vis: AuNPs de forma esférica e monodispersas. Nesta técnica só são visualizados os núcleos de Au (electrodensos), mas não se observam os revestimentos. Esta técnica microscópica, que permite obter informação estrutural sobre materiais de origem biológica e não biológica e permite observar a morfologia dos metais com elevada

resolução, foi utilizada de forma complementar na determinação do diâmetro médio de AuNPs (Sickafus, 1992; Soares, 2009).



**Figura 23** – Imagem TEM das AuNPs de citrato. AuNPs esféricas, monodispersas (cedida por Soares, 2010, Departamento de Química Inorgânica, FCUP).

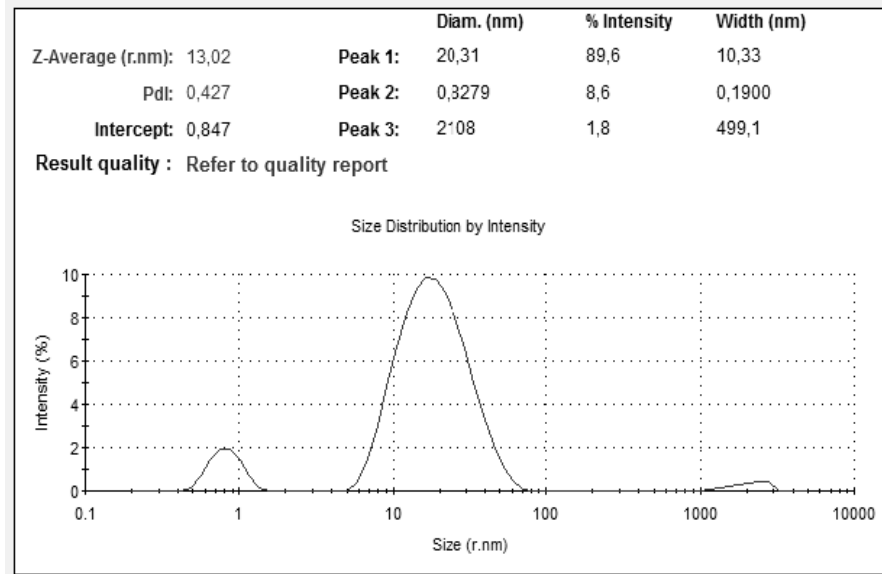
Para a caracterização das AuNPs de citrato utilizaram-se duas técnicas: a dispersão de luz dinâmica (DLS) e a medida de potencial zeta ( $\zeta$ ). Nas medições de DLS, obteve-se um valor de, aproximadamente, 20 nm para o diâmetro hidrodinâmico das AuNPs (Figura 24) (Soares, 2009).

A DLS é uma técnica adequada para a determinação do diâmetro hidrodinâmico médio de AuNPs numa solução coloidal. A intensidade da luz dispersa, medida por esta técnica, está relacionada com a intensidade de flutuação do movimento Browniano das NPs e relaciona-o com o tamanho das mesmas. A medição da dispersão de luz dinâmica permite ainda determinar distribuições de raios hidrodinâmicos, ou seja, avaliar a dispersão dos tamanhos das NPs (Soares, 2009).

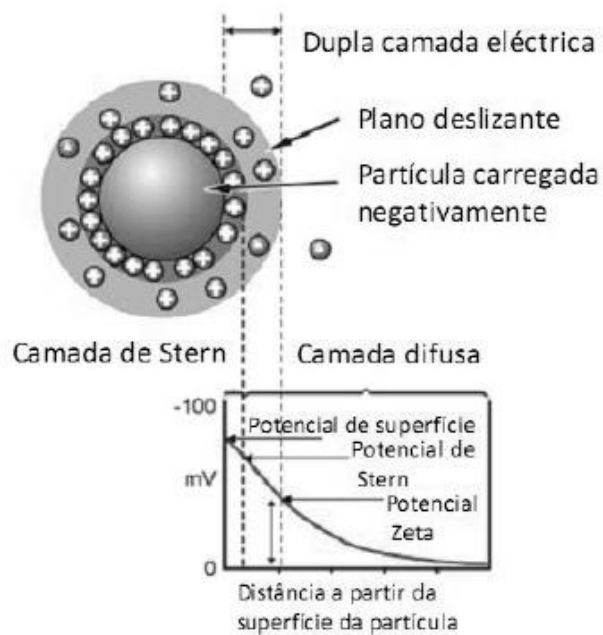
O potencial zeta ( $\zeta$ ) é o potencial electrostático gerado pela acumulação de iões na superfície da partícula e é útil na determinação da carga de superfície AuNPs (Soares, 2009).

A superfície da partícula está organizada numa dupla camada eléctrica, composta pela região interna ou camada de Stern (em que os iões estão fortemente ligados à superfície) e a região externa ou camada difusa (em que os iões estão ligados à superfície de um modo mais fraco). Na camada difusa existe uma fronteira em que os iões e as partículas formam uma entidade estável, denominada de plano deslizante, e o potencial existente nesta fronteira é designado de potencial zeta (Figura 25) (Soares, 2009).





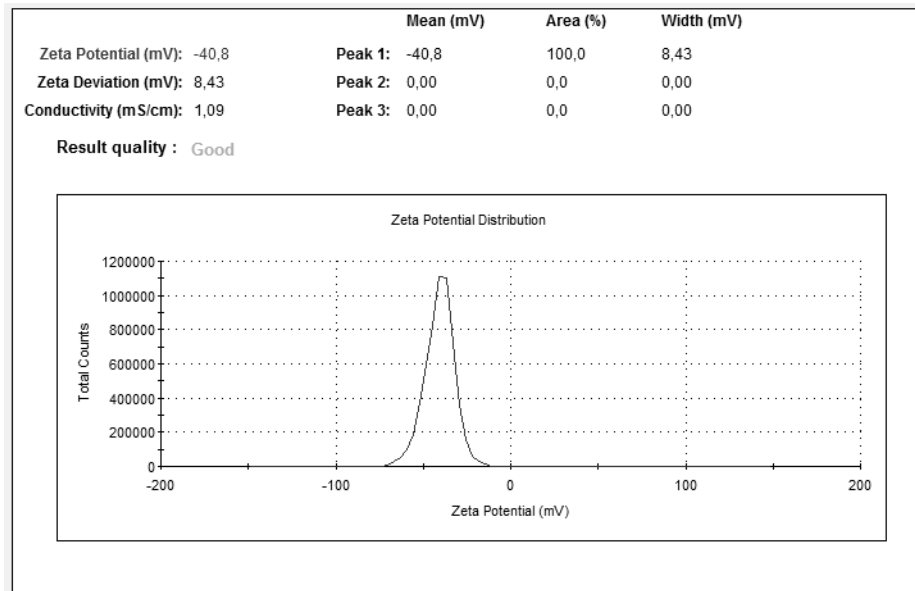
**Figura 24** – Imagem DLS das AuNPs de citrato. Tamanho médio de, aproximadamente, 21 nm. Nota: a matéria que recobre as AuNPs não é detectada (cedida por Soares, 2010, Departamento de Química Inorgânica, FCUP).



**Figura 25** – Representação esquemática do potencial zeta à superfície de uma partícula (Soares, 2009).

O potencial zeta ( $\zeta$ ), que mede o potencial electrostático na interface “dupla camada eléctrica”, obtido para a solução coloidal das AuNPs de citrato, foi de -40,8 mV. O valor obtido está em consonância com o apresentado na literatura (Brewer *et al.*, 2005). O valor apresentado é o resultado da contribuição da carga da superfície da NP metálica,

do agente de revestimento – citrato (molécula negativa) e da carga da esfera de hidratação (agente de revestimento e líquido adjacente) (Figura 26) (Soares, 2009).



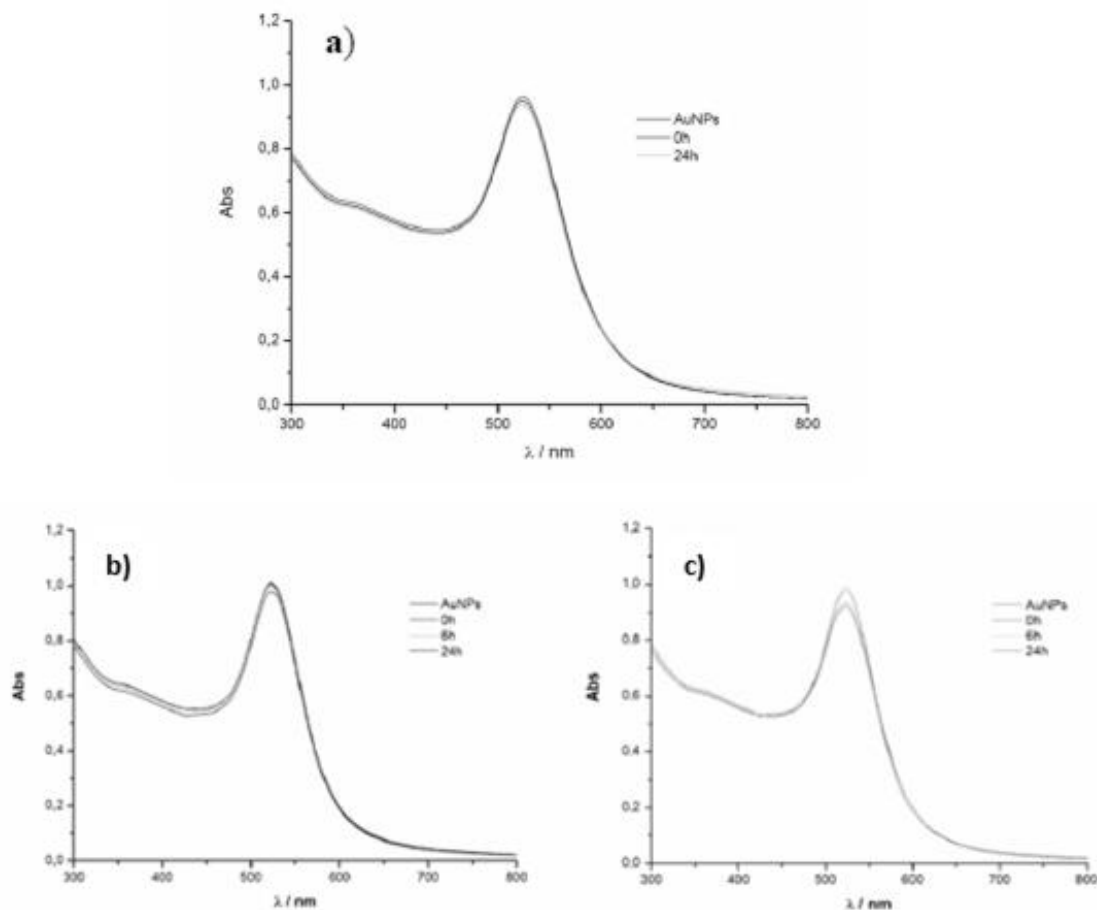
**Figura 26** – Imagem de Potencial Zeta das AuNPs de citrato. Valor medido: -41 mV (cedida por Soares, 2010, Departamento do Química Inorgânica, FCUP).

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  $\zeta$ , maiores as repulsões electrostáticas entre as partículas e, portanto, maior a sua resistência à agregação (Soares, 2009).

As AuNPs revestidas de citrato foram, posteriormente, funcionalizadas com o MUA e com dois péptidos: CALND e CALNS, os quais apresentavam, na sua constituição, um resíduo que continha um grupo tiol, a cisteína, na posição N-terminal. Verificou-se a troca do citrato, que revestia as AuNPs, por estes novos agentes de revestimento. As estruturas químicas dos péptidos CALND e CALNS são muito semelhantes, possuindo uma sequência inicial de quatro aminoácidos iguais entre as duas estruturas químicas, diferindo apenas no último aminoácido, ácido aspártico e serina, respectivamente (Tabela 3). É através da cisteína, aminoácido existente na outra extremidade do pentapéptido, que os péptidos CALND e CALNS se adsorvem à superfície metálica da AuNP, uma vez que este aminoácido possui um grupo tiol na sua cadeia lateral. Os aminoácidos terminais dos pentapéptidos (ácido aspártico no CALND e serina no CALNS), conferem à AuNP funcionalizada as suas características de solubilidade e estabilidade coloidal na solução onde estão dispersas, com base na sua polaridade e carga (Soares, 2009).

A eficácia da funcionalização, assim como as alterações provocadas nas AuNPs de referência (revestidas de citrato), foram averiguadas utilizando os métodos já usados para a caracterização das AuNPs de citrato após a sua síntese (espectrofotometria de UV/Vis, TEM e medição da dispersão de luz (tamanho das NPs e potencial  $\zeta$ ) (Soares, 2009).

Não foram verificadas alterações na banda plasmónica de 520 nm, característica das AuNPs de citrato, quando se realizou o ensaio de espectrofotometria de UV/Vis para os outros tipos de AuNPs. Acresce ainda referir que se verificou que a funcionalização das AuNPs com estes revestimentos provocou uma melhoria, ainda que ligeira, na estabilização das AuNPs, com um acréscimo na intensidade da banda plasmónica (Figura 27) (Soares, 2009).



**Figura 27** – Espectros de absorção de UV/Vis de AuNPs antes e após da funcionalização com MUA (a) CALND (b) e CALNS (c) às 0h, 6h e 24h (Soares, 2009).

Como já foi referido, o TEM apenas reconhece a matéria com elevada densidade electrónica, não distinguindo a matéria orgânica, pelo que não foram visíveis quaisquer

diferenças no aspecto e tamanho das AuNPs revestidas com MUA, CALND e CALNS (Soares, 2009).

Foram efectuadas, no Departamento de Química Inorgânica da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, medições de DLS para as AuNPs funcionalizadas com MUA e péptidos (CALND e CALNS). Analisando os resultados obtidos com esta técnica, foi possível constatar quais as alterações, no que diz respeito ao tamanho das NPs revestidas com os novas moléculas orgânicas, em comparação com as de citrato (Soares, 2009).

Como podemos observar na Tabela 4, com os valores obtidos por DLS há, efectivamente, um aumento hidrodinâmico das NPs após a sua funcionalização com MUA, CALND e CALNS, em relação as AuNPs de citrato. Com estes resultados, foi possível comprovar que a funcionalização foi conseguida com êxito, sendo o citrato substituído por MUA e pelos péptidos na superfície das AuNPs (Soares, 2009).

**Tabela 4** - Valores dos diâmetros médios das AuNPs com os diferentes agentes de revestimento utilizados na funcionalização (adaptado de Soares, 2009).

<b>AuNPs + Agentes de revestimento</b>	<b>Diâmetro / nm</b>
Citrato	$22,4 \pm 5,7$
11-MUA	$33,2 \pm 9,8$
CALND	$35,1 \pm 9,9$
CALNS	$34,9 \pm 9,6$

Quando são efectuadas medições por DLS, se as soluções coloidais de NPs apresentarem agregação das mesmas, esta técnica permite constatá-lo de forma muito eficaz. Foi verificado, pelos resultados de DLS, que as AuNPs funcionalizadas com MUA, CALND e CALNS, aumentavam os valores de dispersão da luz, sinal de ocorrência de agregação (Nath e Chilkoti, 2001; Soares, 2009).

Como todos os agentes de funcionalização utilizados têm cargas negativas a pH 7, tal como o agente de revestimento original, não ocorreu alteração significativa do potencial  $\zeta$ . Na Tabela 5, podemos observar que todas as NPs apresentam valores de potencial  $\zeta$  muito semelhantes.

**Tabela 5** - Valores de potencial  $\zeta$  à superfície das AuNPs com os diferentes agentes de revestimento utilizados na funcionalização (adaptado de Soares, 2009).

<b>AuNPs + Agente de Revestimento</b>	<b>Potencial <math>\zeta</math> / mV</b>
Citrato	$(-44,7 \pm 7,5)$
11-MUA	$(-37,3 \pm 8,4)$
CALND	$(-47,1 \pm 6,0)$
CALNS	$(-40,5 \pm 7,0)$

Embora todos estes valores de potencial zeta sejam negativos, as NPs revestidas com o agente de revestimento MUA têm carga superficial mais positiva do que as AuNPs de referência, revestidas de citrato (Soares, 2009).

Com base nestes resultados de potencial zeta, a ordem decrescente de carga negativa dos diferentes tipos de AuNPs é: CALND > citrato > CALNS > MUA.

Um aspecto importante a ter em conta, em relação aos diferentes tipos de AuNPs, é o facto destas soluções coloidais serem muito sensíveis a alterações do pH. Tanto as AuNPs revestidas de citrato como as AuNPs revestidas de péptido parecem evidenciar estabilidades semelhantes; no entanto, as funcionalizadas com péptido começam a agregar para valores de pH mais elevados do que as de citrato. Quando o valor de pH do meio onde as AuNPs estão dispersas é muito baixo (valores inferiores a 3), existem muitos iões  $H^+$  e poucos iões de carga negativa na solução. São os iões de carga negativa em solução que mantêm as AuNPs suficientemente afastadas umas das outras, evitando fenómenos de agregação. Se AuNPs agregarem, ocorre uma diminuição da absorção da banda plasmónica e do desvio da mesma para a direita. A solução de AuNPs apresenta uma cor arroxeadada e, decorrido algum tempo, forma-se um depósito de NPs no fundo do frasco que as acondiciona, indicando que a estabilidade coloidal das AuNPs varia ao longo do tempo. Para valores de pH compreendidos entre 6 e 11, as AuNPs apresentam-se bastante estáveis, mantendo a solução coloidal a sua cor característica (vermelho rubi). Esta informação é muito importante e até encorajadora, na perspectiva da aplicação destas AuNPs na biomedicina, dado que o pH fisiológico é 7.

## 6. Determinação da viabilidade celular

A viabilidade celular é o parâmetro mais frequentemente investigado nos testes citotóxicológicos. A viabilidade das células em cultura pode ser determinada monitorizando vários processos celulares, através de diferentes medições baseadas em reacções químicas do metabolismo celular (Kroll *et al.*, 2008; Stone *et al.*, 2009; Marquis *et al.*, 2009; Mosmann, 1983).

Para avaliar a citotoxicidade dos diferentes tipos de AuNPs nas células HepG2, foram utilizados dois testes de viabilidade celular: o ensaio do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) e o ensaio da libertação de Lactato Desidrogenase (LDH). O primeiro ensaio foi realizado para todos os tipos de AuNPs (citrato, MUA, CALND e CALNS) e respectivos veículos, nos tempos de 6, 24, 48, 72 e 96 horas de incubação. As células HepG2 foram expostas a soluções de AuNPs de citrato (AuNPs de referência) e AuNPs MUA de concentrações de 1, 5, 10, 30, 100 e 200  $\mu\text{M}$ . As concentrações das soluções de AuNPs revestidas com os pentapéptidos CALND e CALNS, a que se expuseram as células HepG2, foram de 10, 30, 100 e 200  $\mu\text{M}$ . O ensaio da libertação de Lactato Desidrogenase (LDH) foi efectuado para as AuNPs de citrato (AuNPs de referência) e AuNPs revestidas com MUA, nas concentrações de 1, 5, 10, 30, 100 e 200  $\mu\text{M}$ , nos tempos de incubação de 6, 24, 48, 72 e 96 horas.

O ensaio de redução do MTT é um ensaio colorimétrico que detecta a actividade mitocondrial das células. Nas células não danificadas, as mitocôndrias não têm a sua função comprometida, reduzindo o corante MTT, que apresenta cor amarela, a um composto de cor azul escura insolúvel, o MTT-formazano, pela enzima mitocondrial succinil desidrogenase. Este MTT-formazano pode ser quantificado pela leitura da sua absorvência no comprimento de onda de 550 nm. O valor de absorvência obtido é representativo tanto do número de células, como da sua viabilidade celular. Nos passos finais da execução do protocolo deste ensaio, é requerida a solubilização das células do MTT-formazano, utilizando o DMSO ou o isopropanol, neste ensaio foi utilizado o DMSO (Mossman, 1983; Stone *et al.*, 2009; Lewinski *et al.*, 2008).

Este método apresenta muitas vantagens quando comparado com outros testes de citotoxicidade, uma vez que o seu procedimento é simples, requer pouca manipulação das células e permite a obtenção de resultados de forma rápida e reprodutível, com a utilização de equipamentos pouco dispendiosos (Marshall *et al.*, 1995; Marquis *et al.*, 2009).

Outro aspecto importante a ter em conta, quando se efectua este ensaio de redução do MTT, é o facto de as AuNPs poderem ter, elas próprias, valores de absorvência

situados no mesmo comprimento de onda em que se fazem as leituras do ensaio do MTT (550 nm). Para verificar se esta interferência podia ser menosprezada, foi executado um ensaio sem a adição dos reagentes do ensaio do MTT (ensaio em branco), para testar os valores de absorvência de todas as AuNPs nas células. Constatou-se que os valores de absorvência de todos os tipos de AuNPs, no comprimento de onda de 550 nm, são desprezáveis e, por isso, podem ser ignorados para efeitos de cálculo da viabilidade celular, sem correr o risco de sobrevalorizar a viabilidade das células incubadas com as AuNPs (Stone *et al.*, 2009; Lewinski *et al.*, 2008).

Além da interferência acima mencionada, o facto de as NPs terem uma grande área superficial aumenta a sua capacidade em adsorver outras substâncias que estejam em contacto com elas. Partindo deste pressuposto, as AuNPs utilizadas nesta investigação poderiam adsorver na sua superfície o MTT-formazano formado, subtraindo-o do extracto celular, contribuindo, deste modo, para subvalorizar a viabilidade celular. Esta situação é mais difícil de controlar, no entanto, se existirem suspeitas de que pode ocorrer, deve realizar-se um outro ensaio para aferir a viabilidade celular. Essa foi uma das razões porque também foi realizado o ensaio de Libertação da LDH. Contudo, a preparação das soluções de diferentes concentrações, dos diferentes tipos de AuNPs, com meio MEM- $\alpha$ , suplementado com FBS (o FBS dispersa as NPs), conduz ao revestimento das mesmas com proteínas, o que pode, de certo modo, reduzir a interferência da adsorção na superfície da NP (Worle-Knirsch *et al.*, 2006; Stone *et al.*, 2009; Lewinski *et al.*, 2008).

Outro efeito interferente a considerar relaciona-se com as propriedades oxidativas superficiais que as NPs podem ter, o que pode interferir com a formação do MTT-formazano resultante da reacção oxidativa, catalisada pela enzima mitocondrial succinil desidrogenase, no teste de MTT (Stone *et al.*, 2009; Lewinski *et al.*, 2008). Sendo assim, é necessário verificar se as AuNPs, na ausência de células, têm valores significativos de absorvência, no comprimento de onda de 550 nm. Este teste foi realizado para todos os tipos de AuNPs, nas concentrações mais elevadas, e os valores de absorvência obtidos foram considerados desprezáveis, o que prova que as AuNPs testadas não têm revestimentos com propriedades oxidativas, susceptíveis de oxidarem o substrato MTT, não interferindo, por isso, no ensaio.

Para executar este ensaio de viabilidade celular, procedeu-se ao crescimento de células HepG2 em placas de cultura celular de 96 poços, nas quais se colocou uma densidade de 150 000 células por poço (200  $\mu$ L). Ao fim de três dias, as células apresentavam-se confluentes nos poços, sendo então incubadas com as diferentes soluções de AuNPs e respectivos veículos (Stone *et al.*, 2009).

A preparação das soluções diluídas a partir da solução concentrada de cada tipo de AuNPs foi executada utilizando o meio MEM- $\alpha$  completo (meio suplementado com FBS, antibióticos, anti-fúngico e transferrina) como solvente (Stone *et al.*, 2009). Todas as soluções diluídas foram preparadas a partir da solução concentrada de AuNPs (526  $\mu\text{M}$  de Au), fornecida pelo Departamento de Química Inorgânica da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

Antes de se pipetarem os diferentes volumes das soluções concentradas de AuNPs, procedeu-se à sua sonicação por dois ciclos de 15 minutos, à temperatura ambiente, com o cuidado de não abrir os frascos das soluções concentradas fora da câmara de fluxo laminar, evitando, deste modo, possíveis contaminações.

As soluções concentradas dos veículos dos vários tipos de AuNPs foram preparadas no laboratório de Toxicologia da Faculdade de Farmácia Universidade do Porto e mantidas à temperatura de  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Primeiro foi preparada a solução concentrada de veículo de citrato, constituída por citrato de sódio e cloreto de sódio (3529  $\mu\text{M}$  e 379  $\mu\text{M}$ , respectivamente) e, a partir desta, prepararam-se as outras soluções de menor concentração de veículo das AuNPs de MUA, CALND e CALNS, que têm na sua composição os agentes de revestimento das correspondentes AuNPs, numa concentração definida,  $[\text{MUA}] = 2,76 \times 10^{-6}\text{ M}$ ,  $[\text{CALND}] = 2,713 \times 10^{-6}\text{ M}$  e  $[\text{CALNS}] = 2,720 \times 10^{-6}\text{ M}$ .

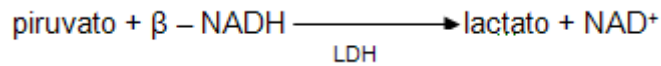
Em cada experiência, todas as condições foram testadas em triplicado e todas as experiências incluíram controlo, ou seja, células que não eram expostas às AuNPs nem aos veículos.

Os resultados foram expressos em relação à percentagem de redução do MTT nas células controlo.

A viabilidade celular pode também ser determinada com base na integridade da membrana citoplasmática das células, parâmetro habitualmente utilizado nos ensaios nanotoxicológicos *in vitro* (Marquis *et al.*, 2009). Neste contexto, foi efectuado, para as células HepG2 incubadas com AuNPs de citrato e MUA, o método da Libertação da Lactato Desidrogenase (LDH), enzima que existe normalmente no citoplasma das células. A redução da viabilidade celular conduz a um aumento da permeabilidade da membrana citoplasmática das células e, deste modo, à libertação da enzima lactato desidrogenase no meio de cultura celular. Para determinar a quantidade de LDH total libertada das células, é frequentemente utilizado o detergente Triton X-100, como controlo positivo no ensaio de libertação da LDH (Stone *et al.*, 2009).



Para o doseamento da LDH, procedeu-se à medição espectrofotométrica de  $\beta$ -NADH a 340 nm, através da reacção de conversão de 22,7 mM de piruvato em lactato, na presença de NADH: segundo a reacção:



Neste ensaio, a LDH libertada das células danificadas, catalisa a redução do piruvato a lactato, com a oxidação simultânea do NADH a  $\text{NAD}^+$ . A taxa de oxidação do NADH é quantificada pela diminuição da absorvência no comprimento de onda de 340 nm. A taxa de oxidação do NADH é inversamente proporcional à actividade da LDH no meio celular, enquanto a quantidade de LDH libertada é proporcional ao número de células danificadas (Monteiro-Riviere e Lang Tran, “Nanotoxicology, Characterization, Dosing and Health Effects”, 2007; Lewinski *et al.*, 2008).

## 7. Internalização dos diferentes tipos de AuNPs

A caracterização da internalização das AuNPs nas células e a sua localização subcelular está intrinsecamente relacionada com os estudos citotxicológicos, porque, ao entrarem nas células, as NPs podem interagir com os componentes celulares. A análise dessas interações é, por isso, muito importante no domínio da investigação da citotoxicidade (Marquis *et al.*, 2009).

Para determinar a internalização das AuNPs nas células utilizaram-se duas técnicas analíticas:

- Determinação qualitativa do Au internalizado nas HepG2, apoiada em microfotografias obtidas por Microscopia de Transmissão Electrónica (*Transmission Electron Microscopy* – TEM);
- Determinação quantitativa do Au internalizado nas células HepG2, pela técnica de análise elementar EAA/AE.

A técnica de TEM permite obter informação detalhada sobre a internalização e localização das AuNPs *in vitro*, pela sua visualização dentro das células ou dos tecidos. Esta técnica, coadjuvada com os métodos espectroscópicos, acrescenta dados sobre a caracterização e composição das NPs internalizadas. A visualização das AuNPs nas microfotografias obtidas por TEM é favorecida, porque o núcleo das AuNPs é constituído por Au (metal electrodense). A aplicação desta técnica microscópica requer cuidado e atenção porque os procedimentos de coloração usados para preparar as amostras

biológicas (neste caso células HepG2) podem levar à formação de nanoagregados electrodensos, que são artefactos e não NPs (Marquis *et al.*, 2009).

A aplicação da técnica de análise elementar EAA/AE para quantificar a internalização das AuNPs em células ou tecidos, pela sua composição elementar em Au (beneficiando-se do facto de no organismo humano não existirem quantidades de Au consideráveis), permite determinar a sua concentração ou a sua massa nessas amostras biológicas.

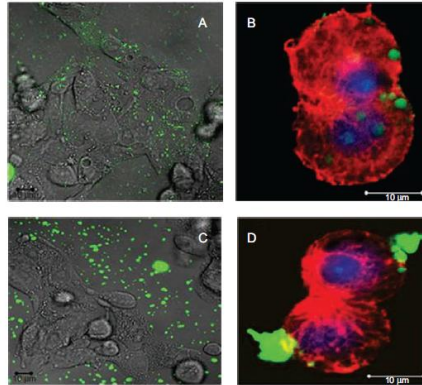
Embora as AuNPs utilizadas neste estudo não tenham apenas Au na sua constituição, sendo funcionalizadas com outras substâncias, o Au é o constituinte mais abundante, porque constitui o seu núcleo (Alkilany e Murphy, 2010).

No entanto, é de referir, como uma desvantagem da EAA/AE, o facto de esta técnica não fornecer nenhum tipo de informação sobre a distribuição das AuNPs no interior das células. Este facto pode repercutir-se de forma negativa na determinação das AuNPs internalizadas, caso não tenham sido eliminadas, no decurso do tratamento prévio das amostras, todas as AuNPs que estavam associadas do lado exterior da membrana plasmática das células. Se isso ocorrer, as AuNPs exteriores serão contabilizadas como AuNPs internalizadas e, conseqüentemente, os resultados serão adulterados (Marquis *et al.*, 2009).

### **7.1. Tratamento das células HepG2 para determinação qualitativa da internalização das AuNPs por TEM**

Para proceder à determinação qualitativa da internalização das AuNPs nas células HepG2 por TEM, foram realizados procedimentos sustentados em investigações descritas na literatura da especialidade, que é importante referir.

Stone e colaboradores, com base num estudo efectuado em 2009, concluíram que NPs de poliestireno, dispersas num meio com soro fetal de bezerro (rico em proteínas) inactivado pelo calor (FCS- *heat-inactivated fetal calf serum*), na concentração de 10%, eram rapidamente internalizadas na linha celular de hepatócitos C3A e em hepatócitos primários de rato (Figura 28), enquanto a internalização das mesmas NPs não ocorria se o meio não fosse suplementado com proteínas.



**Figura 28** – Linha celular de hepatócitos humanos C3A (A e C) e hepatócitos primários de rato (B e D) tratados com NPs fluorescentes de poliestireno (a verde) de 20 nm de diâmetro (A e B) e 200 nm diâmetro (C e D), incubadas durante 1 hora, *in vitro*. As imagens A e C foram obtidas por microscopia de contraste brilhante sobrepostas com uma imagem fluorescente. As imagens B e D foram obtidas com microscópio confocal, onde o que está corado de vermelho representa o citoesqueleto de F-actina e o azul representa a região nuclear (Stone *et al.*, 2009).

Assim, os resultados deste estudo sugerem que a adição de soro ao meio de cultura celular, além de favorecer a dispersão das NPs, favorece a internalização de pequenos aglomerados e/ou NPs individualizadas, nas células. Por outro lado, poder-se-á, também, admitir que as proteínas adsorvidas à superfície das NPs interagem com os receptores da superfície celular, conduzindo à sua internalização pelas células. Obviamente que o aumento da entrada das NPs nas células pode, conseqüentemente, provocar maior citotoxicidade (Stone *et al.*, 2009; Tkachenko *et al.*, 2003; Tkachenko *et al.* 2004).

Com base neste estudo de Stone e colaboradores (2009) e em outros da especialidade (Tkachenko *et al.*, 2003; Tkachenko *et al.* 2004), as células HepG2, do presente estudo, cresceram em MEM- $\alpha$  suplementado com 10% de FBS, antibióticos, anti-fúngico e transferrina. A incubação das células HepG2 foi efectuada em placas de 96 poços (densidade celular inicial de 150 000 células por 200 $\mu$ L), onde as células cresceram até atingirem a confluência (3 dias). De todos os tipos de AuNPs foram preparadas soluções diluídas nas concentrações de 10, 30, 100 e 200  $\mu$ M (*vide* Capítulo II, 3). O tempo de exposição das células HepG2 às diferentes concentrações dos diferentes tipos de AuNPs foi de 24 horas (Chithrani *et al.*, 2006; Arnida e Ghandehari, 2009).

Em suma, em cada placa de 96 poços, 6 poços foram expostos a cada uma das diferentes concentrações de um só tipo de AuNPs, sendo preparada uma placa para cada um dos 4 tipos de AuNPs testadas.

Após 24 horas de exposição (Connor *et al.*, 2005; Stone *et al.*, 2009; Alkilany *et al.*, 2009), a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, executaram-se os seguintes procedimentos:

- Aspiração do meio de cultura dos 96 poços da placa;
- Lavagem das células que se encontram no fundo dos poços, 3 vezes, com HBSS com cálcio e magnésio (HBSS ++), aquecido a 37°C. Este procedimento foi executado com muito cuidado para não destacar as células, que se perderiam por aspiração (Arnida e Ghandehari, 2009);
- Destacamento das células da placa de 96 poços com 50 µL/poço de tripsina 0,25%, previamente aquecida, incubando-se a 37 °C durante 2 a 3 minutos para que a enzima actue;
- Paragem da acção de tripsinização com 200µL/poço de meio MEM-α completo (com FBS). A inactivação da tripsinização só se consegue eficazmente com a presença de FBS;
- Recolha de cada condição da experiência (células controlo, células expostas a uma solução de AuNPs de concentração de 10 µM, 30 µM, 100 µM e 200 µM), para tubos devidamente identificados;
- Centrifugação destas suspensões celulares, a 300 g, durante 10 minutos, com aceleração e desaceleração gradual (estas condições de centrifugação não são muito agressivas, para evitar o rebentamento das células);
- Rejeição do sobrenadante e ressuspensão das células com HBSS ++ (cerca de 2 mL), para lavagem mais eficaz das células, assegurando-se a eliminação das AuNPs que ainda estão ligadas às células HepG2 do lado exterior da membrana citoplasmática. Este procedimento foi efectuado 3 vezes;
- Após a última centrifugação, eliminação do sobrenadante e ressuspensão das células (*pellet* ou resíduo) em 1250 µL de HBSS ++;
- Retirada de 250 µL deste volume de suspensão celular para um eppendorf, para, posteriormente, efectuar o doseamento da proteína;
- Centrifugação dos restantes 1000 µL a 300 g, durante 10 minutos, com aceleração e desaceleração gradual. Rejeitou-se o sobrenadante e guardou-se o resíduo de células (*pellet*);
- Ao *pellet* (células) foi adicionado 20 vezes o seu volume de gluteraldeído a 2,5 % em tampão de cacodilato de sódio (0,2 M; pH 7,2-7,4; 4°C), que é o agente de fixação das células (durante duas horas) (Arnida e Ghandehari, 2009);

A preparação das amostras para TEM foi um procedimento moroso, que incluiu várias fases, nomeadamente fixação das células, várias lavagens com tampão de cacodilato de

sódio, pós-fixação com tetróxido de ósmio a 2% em tampão de cacodilato de sódio (0,2 M; pH 7,2-7,4; 4°C), desidratação com álcool e óxido de propileno e, por fim, a impregnação e inclusão da amostra biológica com o recurso a óxido de propileno e epon.

As amostras foram, posteriormente, seccionadas, observadas e fotografadas no microscópio de TEM da Faculdade de Desporto da Universidade do Porto.

Para além de microfotografias obtidas por TEM de células HepG2 incubadas com os diferentes tipos de AuNPs, utilizadas neste estudo (AuNPs de citrato, MUA, CALND CALNS), também se fotografaram células da mesma linha celular não expostas às AuNPs (células controlo).

## **7.2. Tratamento das células HepG2 para determinação quantitativa da internalização das AuNPs por EAA/AE**

A preparação das amostras para a determinação do Au que se encontra no interior das células HepG2 por EAA/AE foi igual à preparação das amostras para observação e obtenção de fotografias por TEM, até à obtenção do *pelet* ou resíduo de células (*vide* 7.1).

Assim, foram adicionados aos respectivos *pelets* 100 µL de HNO<sub>3</sub> e 100 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrados, reagente comumente designado por água-régia. Estes extractos celulares foram colocados na estufa a 95 °C, durante cerca de 6 horas, para serem digeridas (digestão ácida e pelo calor).

Este ensaio experimental foi realizado em três experiências independentes, tendo sido testadas todas as condições em duplicado. Foram retiradas alíquotas das soluções concentradas de todos os tipos de AuNPs testadas e de todas as soluções diluídas de AuNPs preparadas (10, 30, 100 e 200 µM) para doseamento do Au nas mesmas. Estas soluções também foram tratadas por digestão ácida com aquecimento.

Numa tentativa de aferir este método de tratamento das amostras, realizaram-se vários ensaios em diferentes condições, quer dos reagentes adicionados, quer do aquecimento ou não das amostras na estufa. Com base nos ensaios realizados, verificou-se que o método da digestão ácida pelo calor permite dosear o Au nas amostras de resíduos de células e nas soluções coloidais de AuNPs. Após digestão ácida pelo calor, fizeram-se doseamentos do Au nas amostras em diferentes tempos (6, 24, 48, 72 e 96 horas), para avaliar a estabilidade das amostras após o tratamento com água-régia. Verificou-se que as amostras obtidas por este método permitiram efectuar o doseamento do Au por EAA/AE sempre que se pretendia, porque as amostras se mantinham estáveis.

Para a quantificação do Au nas amostras, utilizou-se um EAA/AE Analyst 600 (PerkinElmer), colocaram-se cerca de 1 mL de cada amostra numa cuvete descartável, ocorrendo a atomização electrotérmica numa câmara de grafite a 2400°C. O espectrofotómetro está equipado com um pipetador automático, que pipeta 20 µL da amostra e 10 µL de uma solução modificadora de matriz, cuja solução-mãe contém 0,75 mL de mercúrio (Hg), 1,25 mL de paládio (Pd) e 35 mL de ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>). As leituras são efectuadas pelo espectrofotómetro a 242,8 nm. Os resultados são comparados a uma curva de calibração. Procedeu-se à elaboração de padrões novos de HAuCl<sub>4</sub>, preparados a partir de uma solução-mãe de concentração de 1000 µg/mL de Au, para obter a curva de calibração, sempre que o aparelho era utilizado em dias diferentes. Este método tem um limite de detecção de 0,65 g/L de Au.

É de salientar que o tempo de exposição das células às diferentes concentrações de AuNPs, para cada um dos ensaios, foi de 24 horas (*vide* Capítulo III, secção 2.2).

## 8. Análise estatística

Na análise estatística dos dados utilizou-se o programa *GraphPad Prism 5*. No tratamento dos dados de citotoxicidade, avaliada pelo método de redução do MTT, foi usado o teste de *1-way ANOVA*, seguindo do teste *post-hoc* de *Bonferroni's Multiple Comparison Test*. Os dados apresentam distribuição paramétrica. Os resultados apresentam-se sob a forma de Média ± SEM (erro padrão da média).

Para o tratamento dos dados de citotoxicidade, avaliada pelo ensaio de libertação da LDH, foi efectuado o teste *1-way ANOVA*. A distribuição dos resultados não foi Gaussiana (não paramétrica) e os testes *post-hoc* efectuados foram o teste *Kruskal-Wallis* e *Dunn's Multiple Comparison test*.

No tratamento estatístico dos dados dos ensaios de internalização para cada tipo de AuNP individualmente, obtidos por EAA/AE, foi efectuado o teste *1-way ANOVA*, seguindo do teste *post-hoc* de *Bonferroni's Multiple Comparison Test*.

No estudo comparativo entre os diferentes tipos de AuNPs, nas diferentes concentrações, foi efectuado o teste *1-way ANOVA*. A distribuição dos resultados não foi Gaussiana (não paramétrica) e os testes *post-hoc* efectuados foram o teste *Kruskal-Wallis* e *Dunn's Multiple Comparison test*.

### ***III – RESULTADOS E DISCUSSÃO***





### III – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos ensaios experimentais realizados no âmbito desta dissertação, são apresentados e discutidos em consonância com os objectivos formulados. Assim, apresentam-se primeiramente os resultados experimentais de citotoxicidade em células HepG2, quer relativos às AuNPs quer aos respectivos veículos. Seguidamente, são apresentados os resultados referentes à internalização das AuNPs nas células HepG2 avaliada qualitativa e quantitativamente.

#### 1. Resultados experimentais de citotoxicidade

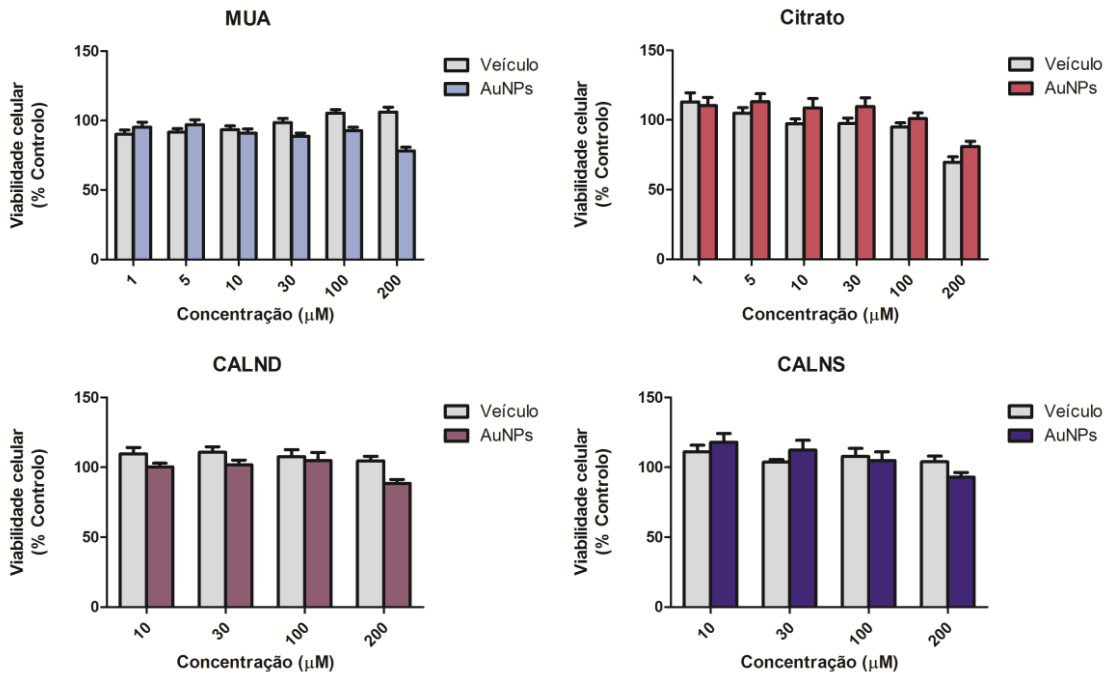
As células HepG2 foram incubadas com soluções de diferentes concentrações de AuNPs. Para as AuNPs de citrato (AuNPs de referência) e AuNPs revestidas de ácido 11-mercaptoundecanóico (MUA), foram preparadas soluções de 1,5,10,30,100 e 200  $\mu\text{M}$  e, para as AuNPs revestidas com pentapéptidos (CALND e CALNS), foram testadas concentrações de 10,30,100 e 200  $\mu\text{M}$ . As células HepG2 foram, ao mesmo tempo e nas mesmas condições experimentais, incubadas com veículos de todos os tipos de AuNPs.

Primeiro foi preparada a solução concentrada de veículo de citrato, constituída por citrato de sódio e cloreto de sódio (3529  $\mu\text{M}$  e 379  $\mu\text{M}$ , respectivamente) e, a partir desta, prepararam-se as outras soluções de menor concentração de veículo das AuNPs de MUA, CALND e CALNS, que têm na sua composição os agentes de revestimento das correspondentes AuNPs, numa concentração definida,  $[\text{MUA}] = 2,76 \times 10^{-6} \text{ M}$ ,  $[\text{CALND}] = 2,713 \times 10^{-6} \text{ M}$  e  $[\text{CALNS}] = 2,720 \times 10^{-6} \text{ M}$ .

Os resultados de viabilidade celular foram calculados e expressos percentualmente em relação aos valores obtidos para as células controlo (viabilidade celular % controlo).

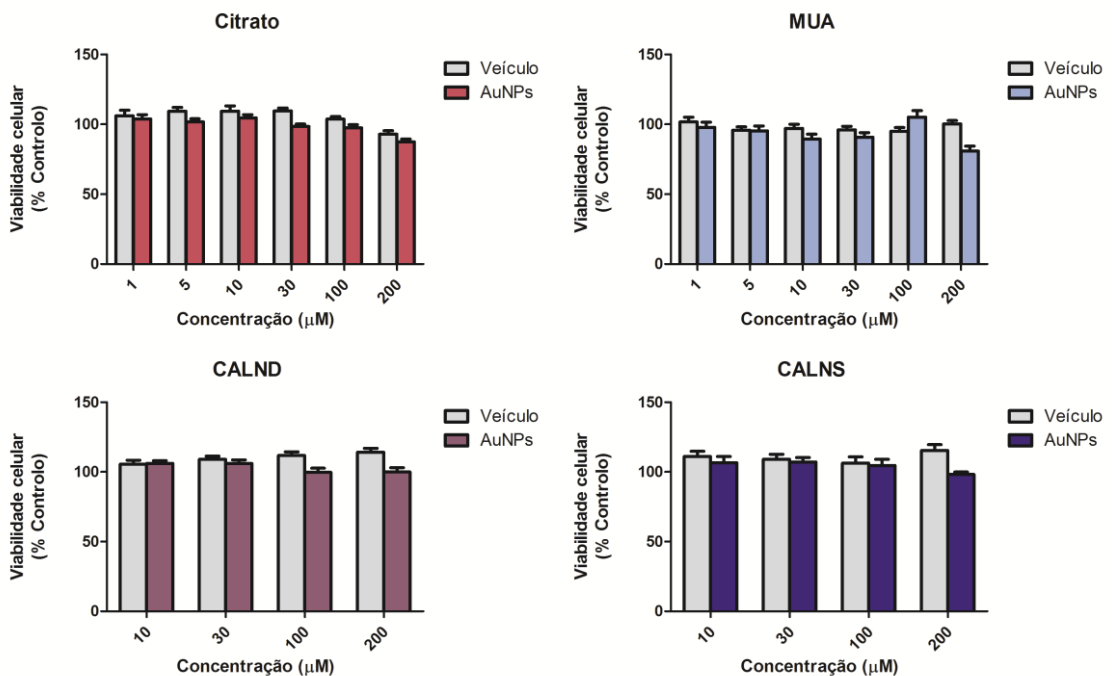
Para cada tipo de AuNP e respectivo veículo, foram feitos ensaios experimentais pelo método de redução do MTT, após 6,24,48,72 e 96 horas de incubação. As figuras 29-33 representam os resultados observados.

**Tempo de incubação 6 Horas**



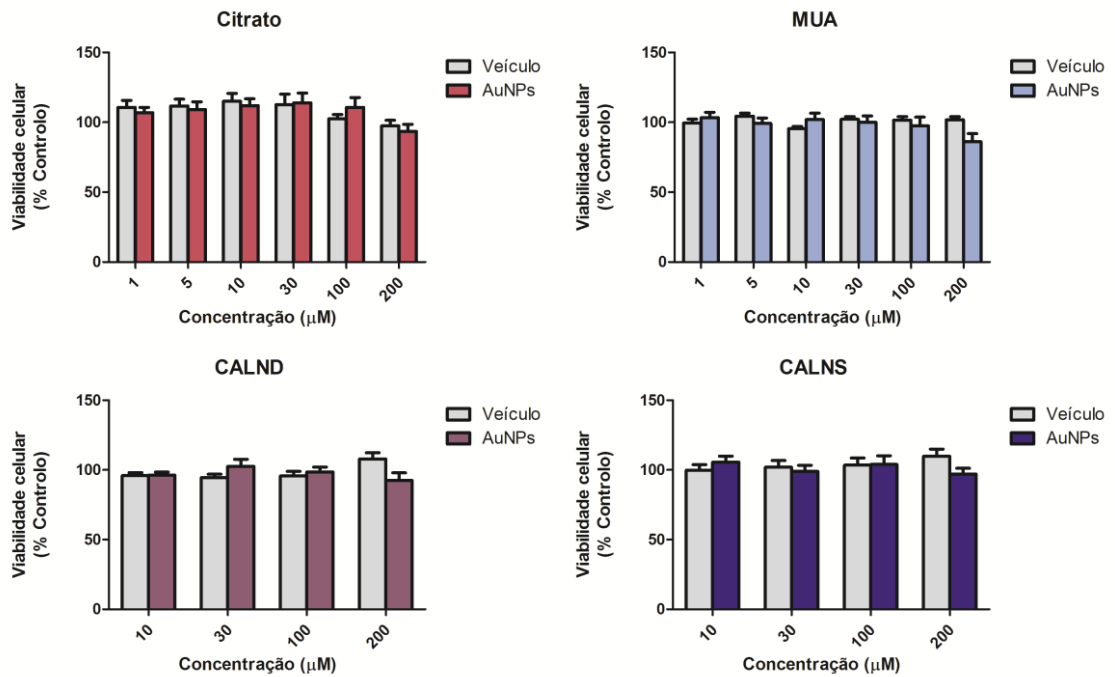
**Figura 29** – Avaliação da citotoxicidade das AuNPs nas células HepG2 pelo ensaio de redução do MTT após 6 horas de incubação.

**Tempo de incubação 24 Horas**



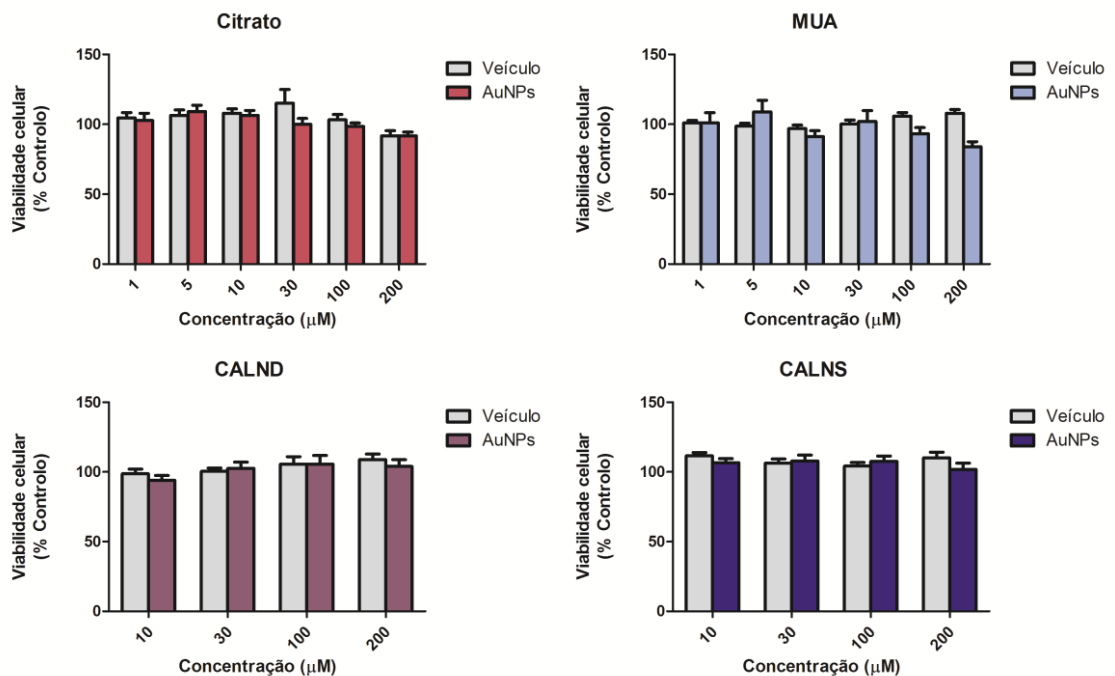
**Figura 30** – Avaliação da citotoxicidade das AuNPs nas células HepG2 pelo ensaio de redução do MTT após 24 horas de incubação.

**Tempo de incubação 48 Horas**



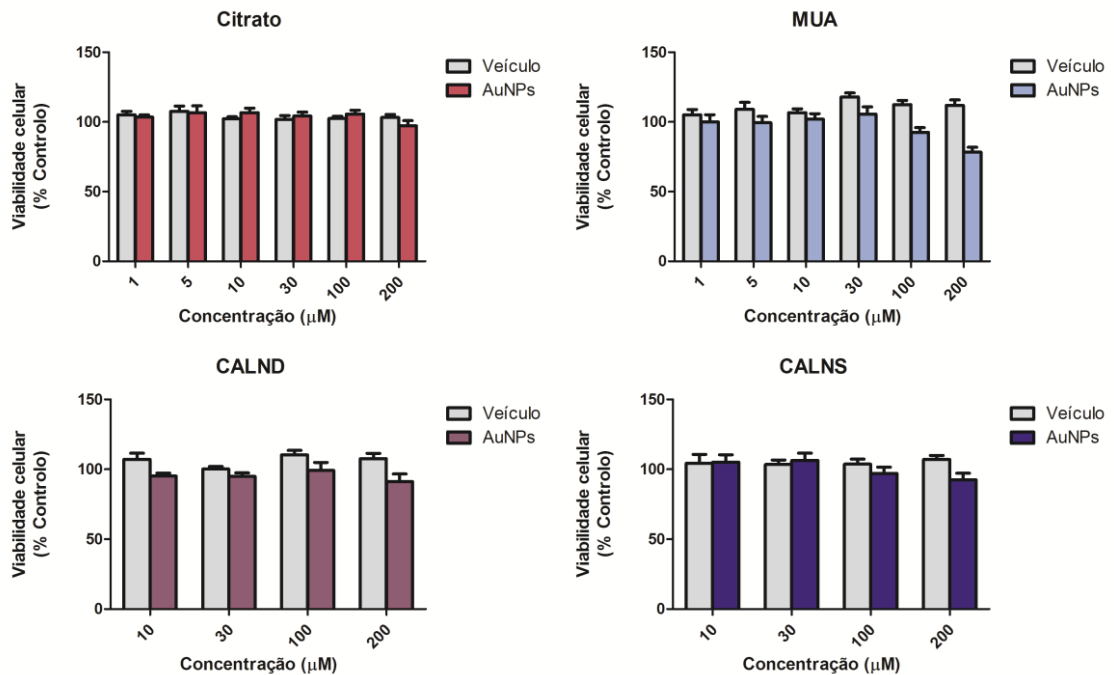
**Figura 31** – Avaliação da citotoxicidade das AuNPs nas células HepG2 pelo ensaio de redução do MTT após 48 horas de incubação.

**Tempo de incubação 72 Horas**



**Figura 32** – Avaliação da citotoxicidade das AuNPs nas células HepG2 pelo ensaio de redução do MTT após 72 horas de incubação.

## Tempo de incubação 96 Horas



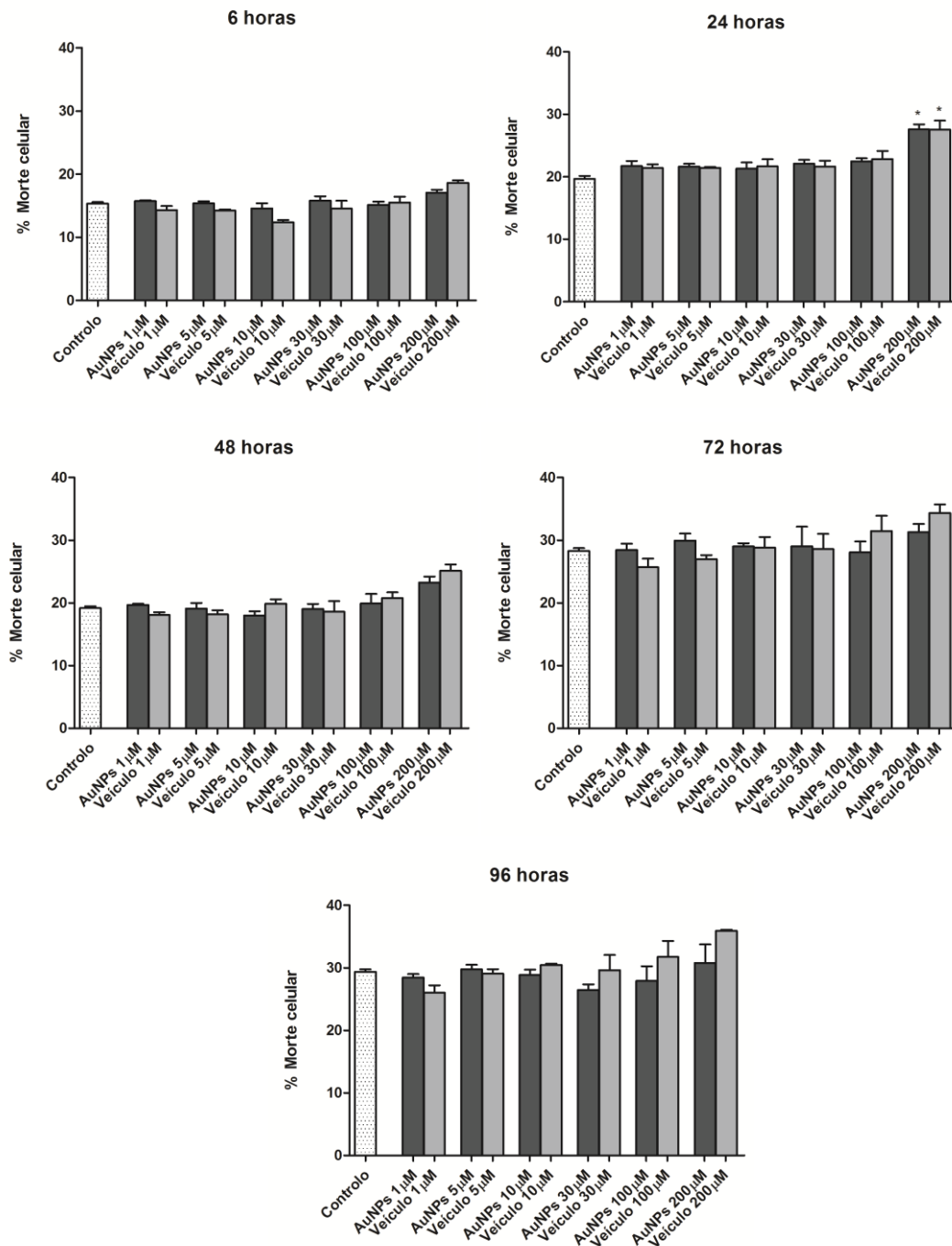
**Figura 33** – Avaliação da citotoxicidade das AuNPs nas células HepG2 pelo ensaio de redução do MTT após 96 horas de incubação.

Da análise e interpretação dos resultados apresentados, verificou-se que as AuNPs testadas não são tóxicas para as células HepG2, nas condições em que decorreram os ensaios laboratoriais, podendo, deste modo, inferir-se que são biocompatíveis com estas células. Quanto aos veículos dos diferentes tipos de AuNPs, e de acordo com os resultados obtidos, também não há evidências significativas de apresentarem citotoxicidade para a linha de hepatoma humano HepG2, nestas condições experimentais.

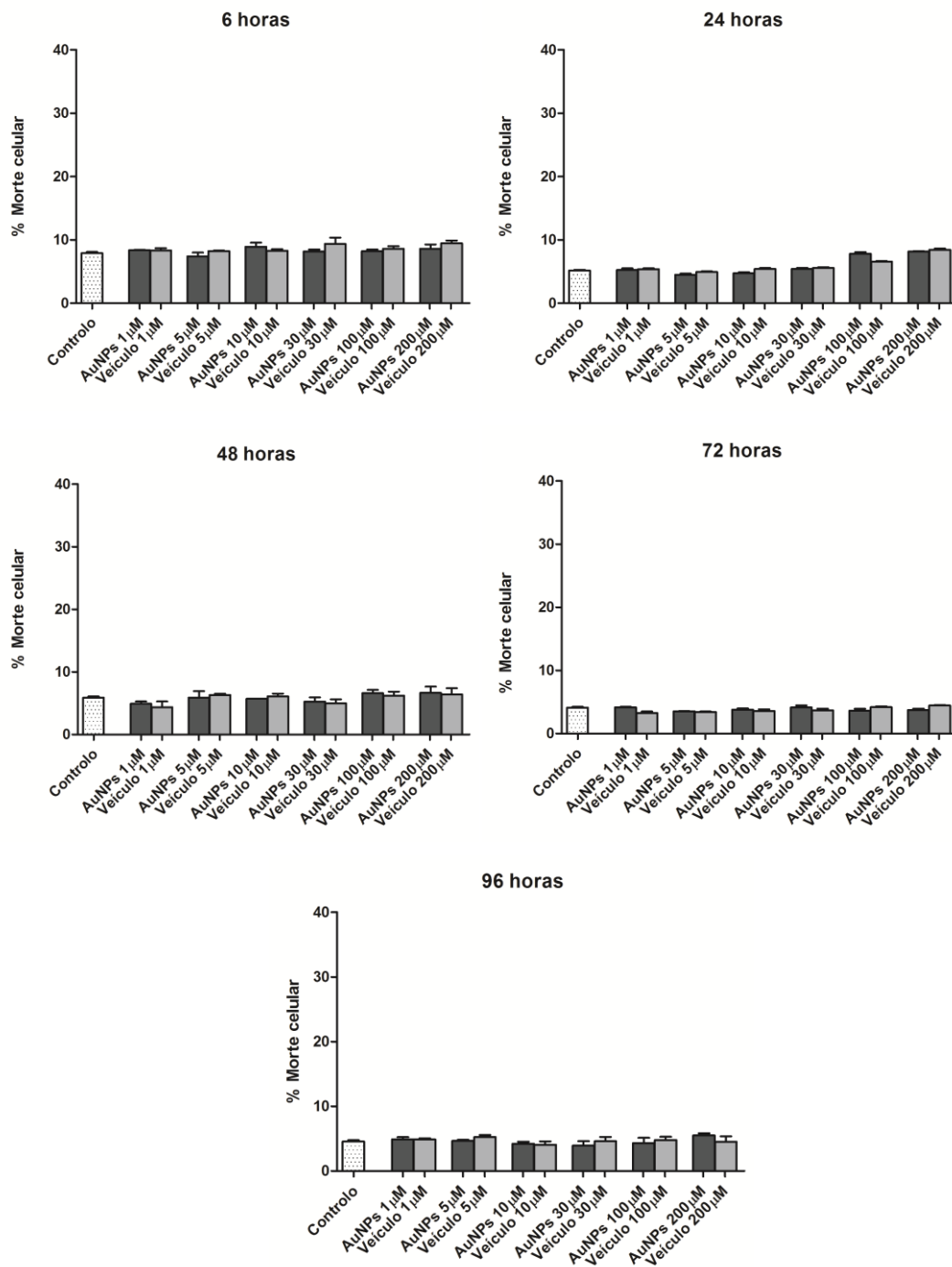
Para além dos ensaios de redução do MTT, e dado que na literatura da especialidade se aconselha a realização de outros testes que afirmam a citotoxicidade de NPs, foram também, neste caso, realizados ensaios de libertação da LDH para as AuNPs de referência (AuNPs de citrato) e para as AuNPs MUA, para constatar se estas NPs eram biocompatíveis com as células HepG2. A vantagem de realizar outros testes de avaliação da citotoxicidade com os mesmos materiais é a de se poderem averiguar interferências nos procedimentos laboratoriais e se interpretarem os resultados obtidos de forma mais correcta, como já foi referido na secção 6 do Capítulo II (Stone *et al.*, 2009; Lewinski *et al.*, 2008).

Os resultados obtidos com o ensaio de libertação da LDH estão em consonância com os resultados obtidos com o ensaio de redução do MTT, logo reforçam a ideia da

não existência de toxicidade dos diferentes tipos de AuNPs para as células HepG2, nas condições em que decorreram os ensaios experimentais (Figura 34 e 35).



**Figura 34** – Avaliação da citotoxicidade das AuNPs revestidas de citrato nas células HepG2 pelo ensaio de Libertação da LDH após 6,24,48,72 e 96 horas de incubação (\*p <0,05 para AuNPs – citrato de 200 µM e veículo correspondente vs. controlo).



**Figura 35** – Avaliação da citotoxicidade das AuNPs revestidas de MUA nas células HepG2 pelo ensaio de Liberação da LDH após 6,24,48,72 e 96 horas de incubação.

Os ensaios citotxicológicos comumente efectuados, nos estudos de investigação da toxicidade das AuNPs, que pesquisam danos nas células, como ruptura da membrana citoplasmática (ensaio de libertação da LDH), irregularidades metabólicas (ensaio de redução do MTT), respostas inflamatórias (produção de ROS, interleucinas

pró-inflamatórias), entre outros, podem não estar directamente relacionados com a senescência celular. Assim, devem ter-se em conta mudanças celulares sub-letais, quando se avalia a exposição a AuNPs nas células. Uma forma de detectar a existência de alterações sub-letais em células é a realização de testes genómicos e proteómicos, com o objectivo de explorar tais alterações na sinalização celular, as quais, caso existam, podem indiciar situações de toxicidade (Lewinski *et al.*, 2008).

Outro aspecto a ter em consideração na discussão dos resultados, e que convém sublinhar, é o facto dos resultados de viabilidade celular apresentados serem obtidos no contexto das condições experimentais anteriormente referidas.

Até ao momento, ainda não se parametrizaram protocolos laboratoriais para ensaios de citotoxicidade de NPs, nem para a prévia caracterização das mesmas, o que dificulta a análise comparativa dos resultados obtidos pelos investigadores que, a nível mundial, desenvolvem estudos neste domínio científico (Lewinski *et al.*, 2008; Stone *et al.*, 2009; Alkilany e Murphy, 2010).

Com base na revisão da literatura específica, verifica-se que nos estudos de citotoxicidade *in vitro* com AuNPs, são utilizadas diferentes linhas celulares, diferentes tempos de incubação das células e os métodos de avaliação usados são também díspares. Estes estudos incluem uma grande variabilidade no que diz respeito às concentrações e tipos de NPs testadas, e as condições de cultura *in vitro* das células também diferem (Tabela 2). Esta grande diversidade de condições experimentais acarretam enormes dificuldades, quando se pretende fazer uma análise comparativa dos resultados das investigações já realizadas e, ao mesmo tempo, considerá-los como pontos de referência para contextualização dos resultados obtidos em estudos posteriores. Tudo isto interfere na avaliação da citotoxicidade das NPs e, conseqüentemente, afectando a relevância das respectivas conclusões do ponto de vista fisiológico (Lewinski *et al.*, 2008).

A biocompatibilidade das AuNPs tem sido demonstrada para diferentes linhas celulares, embora tenham sido utilizadas AuNPs de vários tamanhos, revestidas com diversos grupos funcionais, apresentando cargas superficiais, rugosidade, estado de agregação e concentração diferentes (Shukla *et al.*, 2005; Connor *et al.*, 2005; Khan *et al.*, 2007; Villiers *et al.*, 2009; Gu *et al.*, 2009; Thomas *et al.*, 2003; Tkachenko *et al.*, 2003; Tkachenko *et al.*, 2004; Fu *et al.*, 2005; Shenoy *et al.*, 2006; Alkilany e Murphy, 2010; Warheit *et al.*, 2008; Villiers *et al.*, 2009; Yen *et al.*, 2009) (*vide* Tabela 2 Quadro Resumo dos resultados de toxicidade das AuNPs *in vitro*).

Contudo, existem trabalhos publicados que relatam toxicidade de AuNPs (Goodman *et al.*, 2004; Tsoi *et al.*, 2005; Takahashi *et al.*, 2006; Pernodet *et al.*, 2006; Patra *et al.*,

*al.*, 2007; Pan *et al.*, 2007; Hauck *et al.*, 2008; Pan *et al.*, 2009). A citotoxicidade das AuNPs referenciada nesses trabalhos parece estar associada ao seu tamanho (Pan *et al.*, 2007; Pan *et al.*, 2009), sendo as AuNPs de tamanhos inferiores a 2 nm de diâmetro as que revelam maior toxicidade para várias linhas celulares. Nestes estudos também se verificou que as AuNPs, com tamanho próximo das AuNPs testadas nos ensaios laboratoriais a que se refere a presente dissertação, cerca de 20 nm, parecem ser as menos tóxicas para as células. Com efeito, Pan e colaboradores realizaram um estudo comparativo de avaliação da citotoxicidade e internalização de AuNPs de tamanhos diversos (inferiores a 1 nm, 1,4 nm e 15 nm), utilizando várias linhas celulares como modelo (células epiteliais: HeLa, células endoteliais: SK-Mel-28, Fibroblastos: L929 e Fagócitos: j774A1), mas possuindo a mesma composição química do núcleo e revestimento. São as AuNPs de tamanho da ordem dos 1,4 nm as que provocam dano celular por necrose após a sua internalização nas células que serviram de modelo ao estudo, constatando ser o tamanho das AuNPs um factor determinante da sua toxicidade (Pan *et al.*, 2007; Pan *et al.*, 2009).

As AuNPs de citrato, MUA, CALND e CALNS, são AuNPs revestidas, não se encontrando o núcleo de Au em contacto com as células HepG2. Enquanto a função das AuNPs está relacionada com a composição do seu *core* (núcleo), o seu revestimento define a sua biocompatibilidade. Claro que, em determinadas situações as AuNPs têm ligandos à sua superfície que concretizam o objectivo para que foram sintetizadas, como, por exemplo, o transporte de substâncias terapêuticas como parte integrante do seu revestimento) (Lewinski *et al.*, 2008). Quando Connor e colaboradores testaram a citotoxicidade de soluções de igual concentração de sais de ouro ( $\text{AuCl}_4$ ) e de AuNPs funcionalizadas com citrato, cisteína e glucose, em células leucémicas humanas K562, verificaram que a solução de  $\text{AuCl}_4$ , apresentava valores de toxicidade na ordem dos 90% para essa linha celular, contrariamente ao verificado para as AuNPs que se mostraram biocompatíveis (Connor *et al.*, 2005; Lewinski *et al.*, 2008).

Neste contexto, o facto de não se terem encontrado sinais de citotoxicidade na linha celular de hepatoma humano HepG2, pode estar relacionado com a utilização de AuNPs revestidas. Convém, no entanto, acrescentar que em muitos estudos de avaliação de citotoxicidade de AuNPs, utilizando como modelo as células HepG2, se verificou a biocompatibilidade das AuNPs com estas células (Patra *et al.*, 2007; Tkachenko *et al.*, 2003; Tkachenko *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2010).

Outros resultados reportados na literatura comprovam a biocompatibilidade de AuNPs funcionalizadas com citrato, cisteína, glucose, biotina, PEG, CTAB, glutatona,



BSA, péptidos, entre outros ligandos (*vide* Tabela 2) (Connor *et al.*, 2005; Takahashi *et al.*, 2006; Khan *et al.*, 2007; Hauck *et al.*, 2008; Villiers *et al.*, 2009; Pan *et al.*, 2009; Gu *et al.*, 2009; Alkilany *et al.*, 2009; Tkachenko *et al.*, 2003; Tkachenko *et al.*, 2004; Thomas *et al.*, 2003; Fu *et al.*, 2005; Shenoy *et al.*, 2006). Os grupos funcionais que permitem assegurar a biocompatibilidade de AuNPs com as células são o citrato (Connor *et al.*, 2005; Patra *et al.*, 2007; Khan *et al.*, 2007; Villiers *et al.*, 2009), e os péptidos, aminoácidos ou proteínas (Shukla *et al.*, 2005; Connor *et al.*, 2005; Tkachenko *et al.*, 2003; Tkachenko *et al.*, 2004).

Posto isto, pode afirmar-se que os resultados obtidos no trabalho experimental implementado, apresentados nesta dissertação, encontram suporte na literatura referida, uma vez que as AuNPs testadas foram revestidas de citrato e pentapéptidos.

Existem referências a outros ligandos, como o PEG, cumarina-PEG-tiol e metoxi-PEG-tiol, glucose, biotina e GHS que também conferem biocompatibilidade às AuNPs (Gu *et al.*, 2009; Fu *et al.*, 2005; Shenoy *et al.*, 2006; Takahashi *et al.*, 2006; Connor *et al.*, 2005; Pan *et al.*, 2009).

Para além do revestimento, a carga superficial das AuNPs parece ter também um papel importante na citotoxicidade das AuNPs. Esta afirmação é sustentada por resultados de trabalhos levados a cabo por investigadores, que afirmam serem as superfícies catiónicas mais tóxicas que as aniónicas. Este facto pode ser devido à afinidade das partículas carregadas positivamente para a membrana plasmática que é carregada negativamente. Os revestimentos de carga neutra, como o PEG, são os mais biocompatíveis (Goodman *et al.*, 2004; Lewinski *et al.*, 2008; Alkilany *et al.*, 2009).

Salienta-se o facto dos revestimentos das AuNPs (citrato, MUA, CALND e CALNS), cuja citotoxicidade se pretendia avaliar com os ensaios laboratoriais desenvolvidos, terem todos carga negativa, avaliada pelo potencial zeta (*vide* Capítulo II, secção 5). Esta carga superficial negativa é, segundo o relatado na literatura, uma razão plausível para não se ter encontrado sinais de citotoxicidade com as AuNPs testadas.

## 2. Resultados experimentais de internalização

A análise e interpretação dos resultados de citotoxicidade devem ser confirmadas com ensaios experimentais que comprovem a internalização dos diferentes tipos de AuNPs nas HepG2. O terceiro objectivo deste estudo prende-se com a avaliação

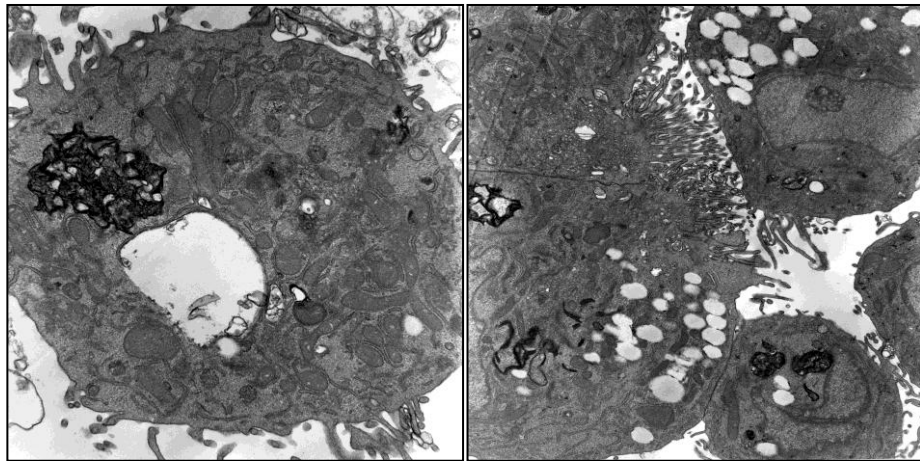
comparativa da internalização dos diferentes tipos de AuNPs, no sentido de verificar se a sua entrada nas HepG2 está relacionada com os seus revestimentos.

Para concretizar este objectivo, recorreu-se a duas técnicas já descritas no Capítulo II: técnica TEM para determinação qualitativa do Au coloidal internalizado nas HepG2, apoiada em microfotografias obtidas por Microscopia de Transmissão Electrónica (*Transmission Electron Microscopy*) e técnica de análise elementar EAA/AE para determinação quantitativa do Au coloidal internalizado nas células HepG2.

### 2.1. Internalização dos diferentes tipos de AuNPs avaliada por TEM

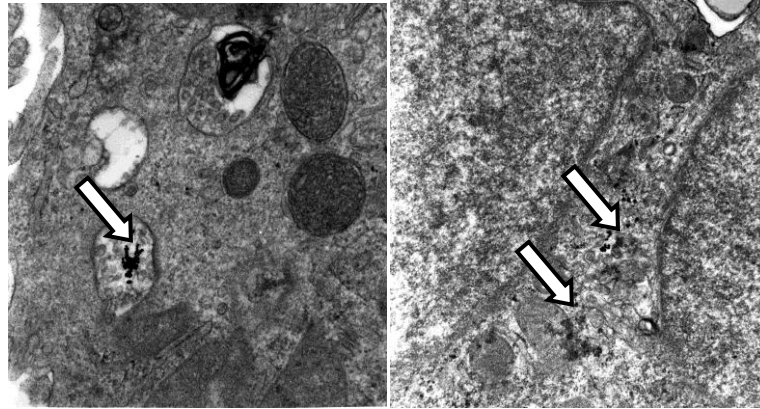
A técnica TEM é referida na literatura como uma ferramenta versátil para visualizar partículas electrodensas, como é o caso das AuNPs cujo núcleo é de ouro (Au), permitindo distingui-las dos componentes celulares (Stone *et al.*, 2009; Lewinski *et al.*, 2008; Arnida e Ghandehari, 2009; Alkilany *et al.*, 2009; Alkilany e Murphy, 2010).

Os resultados obtidos por meio desta técnica são apresentados através de microfotografias de células HepG2 não incubadas com AuNPs (controlo), Figura 36 e de células HepG2 incubadas com soluções dos diferentes tipos de AuNPs, Figuras 37-43.

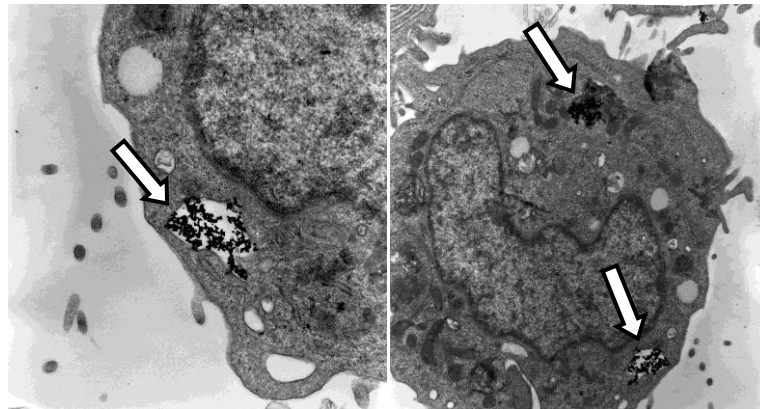


**Figura 36** – Microfotografias TEM de células HepG2 não incubadas com AuNPs controlo (obtidas com a colaboração do Professor J.A. Duarte, Departamento de Biologia do Desporto, Faculdade de Desporto, Universidade do Porto).

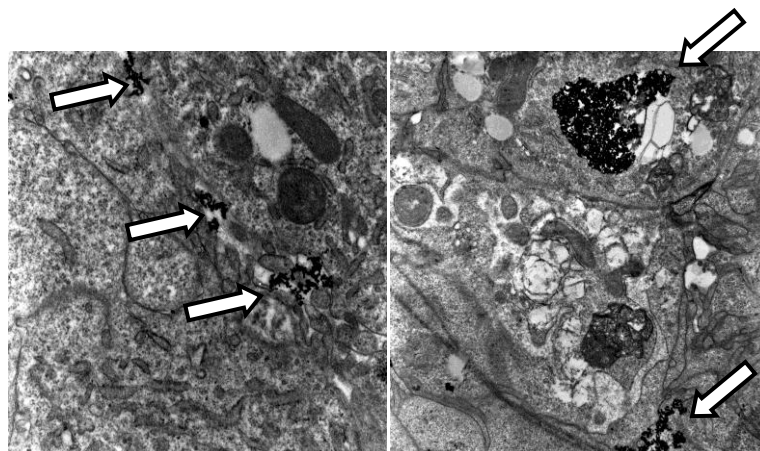
Os primeiros ensaios foram realizados com células HepG2 incubadas com soluções de AuNPs de citrato nas concentrações de 1, 30 e 100  $\mu\text{M}$  durante 24 horas, Figuras 37, 38, 39 e 40. Nos ensaios experimentais relativos às AuNPs MUA, AuNPs CALND e AuNPs CALNS, as células foram incubadas com concentrações de AuNPs de 100  $\mu\text{M}$ , durante 24 horas, Figuras 41, 42 e 43.



**Figura 37** – Microfotografias TEM de células HepG2 incubadas, 24 horas, com uma solução de AuNPs de citrato na concentração de 1  $\mu$ M (obtidas com a colaboração do Professor J.A. Duarte, Departamento de Biologia do Desporto, Faculdade de Desporto, Universidade do Porto).



**Figura 38** – Microfotografias TEM de células HepG2 incubadas, 24 horas, com uma solução de AuNPs de citrato na concentração de 30  $\mu$ M (obtidas com a colaboração do Professor J.A. Duarte, Departamento de Biologia do Desporto, Faculdade de Desporto, Universidade do Porto).



**Figura 39** – Microfotografias TEM de células HepG2 incubadas, 24 horas, com uma solução de AuNPs de citrato na concentração de 100  $\mu$ M (obtidas com a colaboração do Professor J.A. Duarte, Departamento de Biologia do Desporto, Faculdade de Desporto, Universidade do Porto).

A preparação das amostras de células HepG2 para observação por Microscopia de Transmissão Electrónica (*Transmission Electron Microscopy* – TEM) é um procedimento moroso e algo agressivo para as células.

Estas microfotografias, para além de permitirem visualizar e localizar o Au coloidal que entrou nas células, também podem fornecer pistas valiosas sobre o mecanismo de internalização das AuNPs. A confirmação desta segunda hipótese só será possível recorrendo a várias técnicas microscópicas combinadas num mesmo estudo, nomeadamente, Microscopia de Força Atómica (AFM), Microscopia Confocal com *Scanning* a Laser (CFLSM) (Shukla *et al.*, 2005), microscopia óptica de fundo escuro (*dark field optical microscopy*) e microscopia de contraste por interferência diferencial (*differential interference contrast microscopy*) (Marquis *et al.*, 2009) e ao desenvolvimento de modelos experimentais com uma análise matemática estruturada (Gao *et al.*, 2005).

A compreensão do mecanismo de internalização das AuNPs nas células é importante para a sua aplicação biomédica, especialmente quando se pretende a sua aplicação como veículos para transporte e cedência de fármacos ou genes (Rosi *et al.*, 2006; Han *et al.*, 2007).

Uma análise cuidadosa das microfotografias obtidas por TEM pode fornecer indicações sobre o destino das AuNPs após a sua entrada nas células. Neste contexto, pode verificar-se se as AuNPs estão livres ou dentro de vesículas, se estão aglomeradas ou individualizadas, se entram no núcleo ou se parecem danificar as organelos celulares.

As microfotografias (Figuras 40, 41, 42 e 43) permitem comparar, do ponto de vista qualitativo, se a internalização nas células HepG2, incubadas com soluções de diferentes tipos de AuNPs na concentração 100  $\mu\text{M}$ , durante 24 horas, está relacionada com os respectivos revestimentos. No entanto, será sempre necessário confirmar estes resultados recorrendo a outras técnicas quer qualitativas quer quantitativas (Alkilany *et al.*, 2009; Marquis *et al.*, 2009; Chithrani *et al.*, 2006; Chithrani e Chan, 2007), ou de EAA/AE.

A técnica utilizada, neste trabalho de investigação, para quantificar o Au internalizado nas células HepG2, após exposição durante 24 horas aos diferentes tipos de AuNPs, foi a EAA/AE.

Nas microfotografias TEM das células HepG2 não incubadas com as AuNPs, que serviram de controlo (Figura 36), as células apresentam um formato pouco característico, com organelos membranares de difícil identificação, com muitos sinais de degenerescência celular, em particular a nível da membrana lipídica plasmática.

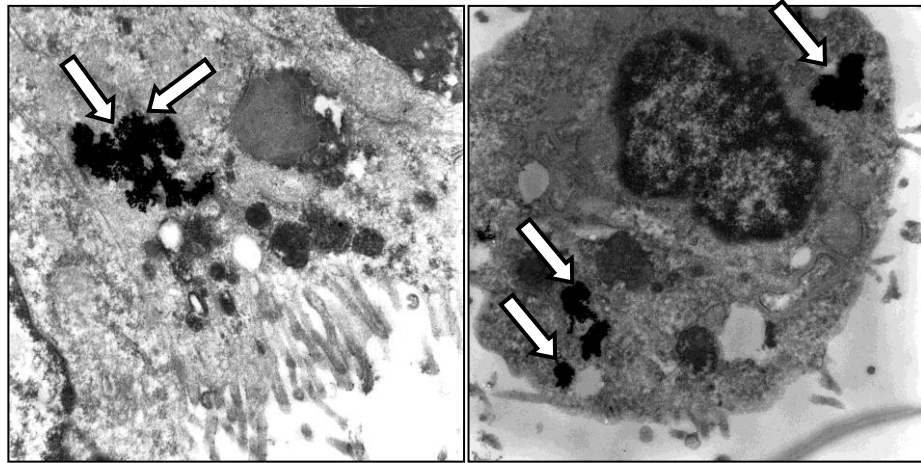
Podem observar-se também muitos detritos celulares no espaço extracelular. Este aspecto que as células apresentam, bem como os detritos visualizados nos espaços exteriores, podem justificar-se pelos procedimentos a que as células são sujeitas para preparação das amostras para observação microscópica. Com efeito, ao longo dos processos laboratoriais são executadas muitas lavagens das células, a sua tripsinização, várias centrifugações, além da fixação, pós-fixação, desidratação, impregnação, inclusão e corte das amostras.

As microfotografias das Figuras 37, 38 e 39, mostram células HepG2 incubadas, durante 24 horas, com uma solução de AuNPs de citrato na concentração de 1  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$ . Estes ensaios inicialmente realizados apenas com AuNPs de citrato, foram considerados ensaios preliminares de afinação da técnica e de determinação da concentração mais adequada para realização dos ensaios definitivos. As setas brancas assinalam as AuNPs internalizadas quer individualizadas quer formando aglomerados.

Com base nestes ensaios, optou-se pela utilização de soluções de todos os tipos de AuNPs na concentração de 100  $\mu\text{M}$ , para incubação das células HepG2 durante 24 horas, para proceder aos ensaios definitivos. Embora se verifique a internalização de AuNPs para todas as concentrações ensaiadas, tomou-se esta opção pelo facto desta parecer mais evidente nas microfotografias relativas à concentração de 100  $\mu\text{M}$  (Figura 39).

Deste modo, para realizar os ensaios definitivos, prepararam-se amostras de células HepG2 para observação microscópica por TEM, a partir de células HepG2 incubadas durante 24 horas, com soluções de AuNPs de citrato, de MUA, de CALND e CALNS na concentração de 100  $\mu\text{M}$ , cujos resultados se apresentam nas Figuras 40, 41, 42 e 43.

Nas microfotografias da Figura 40, foi observado um maior número de detritos celulares no espaço extracelular (aparentemente maior do que no controlo). Este facto é sinal de que as AuNPs de citrato provocaram algum tipo de citotoxicidade nas células HepG2.

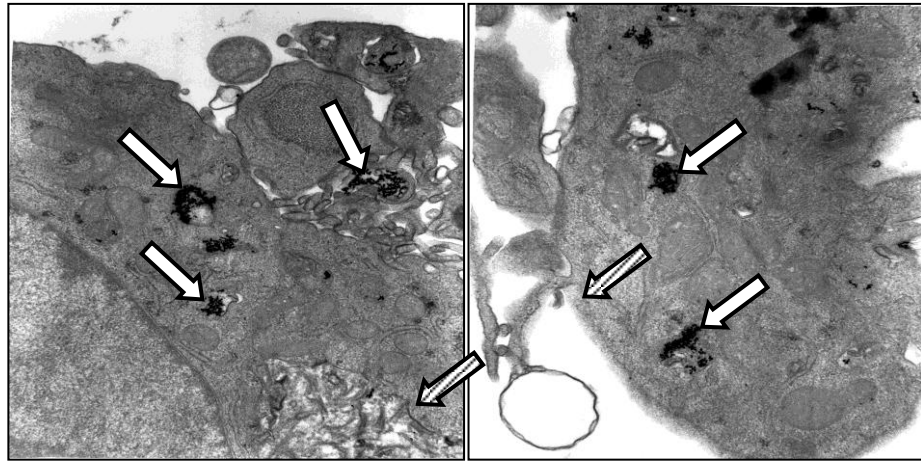


**Figura 40** – Microfotografias TEM de células HepG2 incubadas, 24 horas, com uma solução de AuNPs de citrato na concentração de 100  $\mu$ M (obtidas com a colaboração do Professor J.A. Duarte, Departamento de Biologia do Desporto, Faculdade de Desporto, Universidade do Porto).

Foram também observadas muitas células com partículas de Au coloidal aglomeradas localmente em espaços delimitados por membrana, que podem ser endossomas precoces e/ou tardios, o que já foi observado por outras equipas de investigadores (indicados na Figura 40 pelas setas) (Mukherjee et al., 2007). As células que captaram Au têm uma menor definição dos seus organelos e aparentam sinais de edema reticular, o que pode ser sinal de maior toxicidade.

Uma solução de AuNPs, revestida com MUA, foi utilizada para avaliar a internalização deste tipo de AuNPs em células HepG2, durante 24 horas (*vide* Capítulo II, secção 7.1). As microfotografias (Figura 41) apresentam resultados semelhantes aos resultados obtidos para as células HepG2 incubadas durante o mesmo tempo e com a mesma concentração de AuNPs de citrato. Observam-se, assim, detritos celulares dispersos no espaço extracelular e células com sinais de necrose.

Parece haver grande captação celular de partículas de Au coloidal aglomeradas localmente em espaços delimitados por membrana, assinaladas na Figura 41 com setas, (provavelmente endossomas precoces e/ou tardios). A análise das microfotografias TEM, relativas às células incubadas com AuNPs MUA, revela que estas NPs aparecem muitas vezes associadas a locais de degenerescência membranar lipídica (setas tracejadas a preto), Figura 41. Não foram observadas AuNPs dispersas no citoplasma nem no núcleo. As células que captaram Au têm uma menor definição dos seus organelos. Os sinais de degenerescência lipídica não são mais evidentes do que no controlo.



**Figura 41** – Microfotografias TEM de células HepG2 incubadas, 24 horas, com uma solução de AuNPs de MUA na concentração de 100  $\mu$ M (obtidas com a colaboração do Professor J.A. Duarte, Departamento de Biologia do Desporto, Faculdade de Desporto, Universidade do Porto).

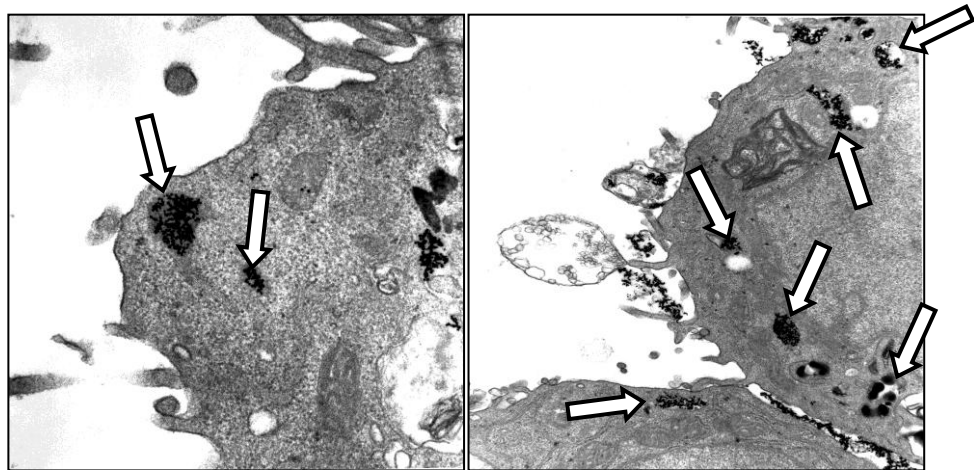
Para a internalização de macromoléculas e partículas, as células utilizam processos de fagocitose, macropinocitose e endocitose mediada por receptores (*receptor-mediated endocytosis*, RME). Este último mecanismo de internalização de substâncias inclui várias vias, nomeadamente a via mediada por caveolina, mediada por clatrina e endocitose independente da caveolina/clatrina, como já foi descrito na Introdução deste trabalho, secção 6 (Conner e Schmid, 2003).

Estas vias de entrada das moléculas nas células utilizam diferentes receptores e distintas cascatas de sinalização celular (Dobrovolskaia e McNeil, 2007). Tem sido sugerido que, quando as partículas têm tamanhos maiores que 500 nm, são fagocitadas pelas células, enquanto as partículas com menores tamanhos são internalizadas por vias de endocitose, mediadas por um receptor específico (Dobrovolskaia e McNeil, 2007; Hess e Tseng, 2007). Quase todas as AuNPs estudadas têm dimensões inferiores a 100 nm e a RME tem sido proposta como o mecanismo primário de internalização celular (Shukla *et al.*, 2005; Chithrani e Chan, 2007; Nativo *et al.*, 2008).

Todos os tipos de revestimentos das AuNPs utilizadas no desenvolvimento destes ensaios experimentais, têm carga negativa, demonstrado pela determinação dos seus potenciais zeta (*vide* Capítulo II, 5). Embora as diferenças dos valores de potencial zeta determinados não sejam muito diferentes, são as AuNPs MUA as que apresentam potencial zeta mais baixo. A membrana citoplasmática das células tem um valor negativo e, é provável que as AuNPs MUA não sejam tão repelidas por esta carga negativa, o que poderá favorecer a sua internalização face às AuNPs de citrato.

Contudo, o que foi observado no decorrer deste trabalho laboratorial, foi que as AuNPs mais internalizadas pelas HepG2 são as que estão revestidas por péptidos (CALND e CALNS). O efeito da carga, na internalização das AuNPs testadas, é, provavelmente, atenuado, pelo facto das soluções de diferentes concentrações com que incubamos com as células serem preparadas com FBS. Assim, as AuNPs ficam revestidas com as proteínas do FBS, revestimento adicional, o que facilita a sua internalização.

Na Figura 42, visualizam-se células HepG2, expostas durante 24 horas a uma solução de AuNPs funcionalizadas com o pentapéptido CALND na concentração de 100  $\mu\text{M}$ .

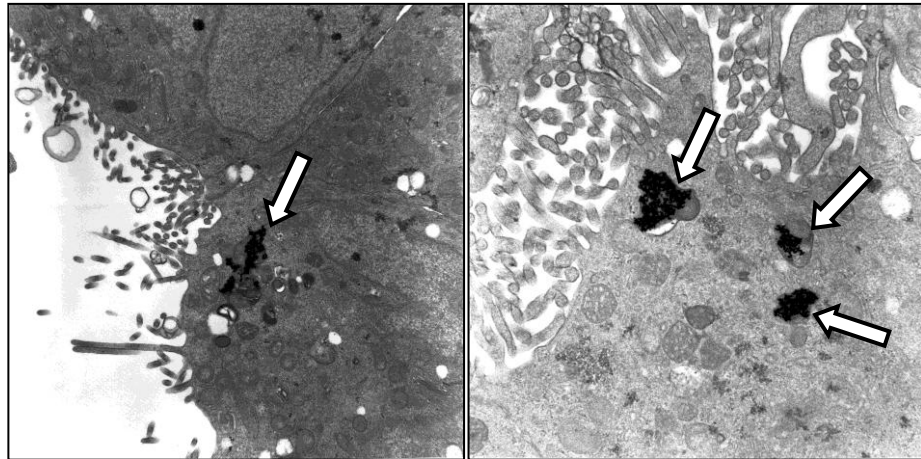


**Figura 42** – Microfotografias TEM de células HepG2 incubadas 24 horas, com uma solução de AuNPs de CALND na concentração de 100  $\mu\text{M}$  (obtidas com a colaboração do Professor J.A. Duarte, Departamento de Biologia do Desporto, Faculdade de Desporto, Universidade do Porto).

Foi observada a presença de células necrosadas e de um grande número de detritos celulares no espaço extracelular. Nestas microfotografias observam-se AuNPs aglomeradas em espaços delimitados por membrana, pensando-se que as AuNPs estejam no interior de endossomas precoces e/ou tardios. Não foram observadas AuNPs isoladas no citoplasma ou no núcleo. Observações microfotográficas por TEM, relativas às células HepG2, expostas a AuNPs CALND revelaram que as células que internalizaram AuNPs apresentavam uma menor definição dos seus organelos, o que pode ser interpretado como um indicador de citotoxicidade.

As células HepG2 foram também incubadas, por um período de 24 horas, com AuNPs revestidas com o pentapéptido CALNS na concentração de 100  $\mu\text{M}$ .





**Figura 43** – Microfotografias TEM de células HepG2 incubadas 24 horas, com uma solução de AuNPs de CALNS na concentração de 100  $\mu$ M (obtidas com a colaboração do Professor J.A. Duarte, Departamento de Biologia do Desporto, Faculdade de Desporto, Universidade do Porto).

Como se pode constatar pela observação das microfotografias da Figura 43, existe um grande número de detritos celulares no espaço extracelular e de células com sinais de necrose, tal como foi referido para os casos anteriores. Na microfotografia da Figura 43, nota-se a presença de células com AuNPs aglomeradas localmente em espaços delimitados por membrana (supõe-se que sejam endossomas precoces e/ou tardios), tal como no caso da AuNPs CALND. Também não foram observadas AuNPs isoladas no citoplasma nem no núcleo e os seus organelos pareciam menos definidos.

Os resultados obtidos com as diferentes AuNPs estão em concordância com resultados já publicados por outros grupos de investigadores, que descrevem, nos seus trabalhos, a capacidade de internalização e a distribuição intracelular das AuNPs esféricas, visualizadas por TEM, dentro de vesículas, mas não no núcleo para AuNPs com estas dimensões, aproximadamente 20 nm (Shukla *et al.*, 2005; Pernodet *et al.*, 2006; Chithrani e Chan, 2007; Khan *et al.*, 2007; Alkilany e Murphy, 2009).

Apesar do mecanismo de entrada das AuNPs nas células ser considerado, de forma genérica, um mecanismo mediado pela ligação com um receptor existente na membrana plasmática (Chithrani e Chan, 2007; Gao *et al.*, 2005; Alkilany e Murphy, 2010; Alkilany *et al.*, 2009; Tkachenko *et al.*, 2003; Tkachenko *et al.*, 2004; Stone *et al.*, 2009), existem AuNPs que têm grupos superficiais, com determinadas características químicas e de arranjo conformacional, que conseguem entrar nas células por permeação directa, ou seja, por um mecanismo independente da endocitose, sem destruição da membrana citoplasmática das células, como os designados *penetrating peptides* (CPPs). Este mecanismo de internalização é muito

semelhante ao que ocorre com a entrada dos péptidos nas células. Foram realizados estudos de internalização utilizando AuNPs de tamanhos muito reduzidos, aproximadamente 6 nm, revestidas com ligandos hidrofóbicos e aniónicos, que mostraram permear as membranas citoplasmáticas das células, tanto a 37° C como a 4° C, sem a destruição da mesma membrana lipídica (Verma *et al.*, 2008). No mesmo trabalho, Verma e colaboradores, utilizaram as mesmas NPs, com um revestimento hidrofóbico, sintetizando dois tipos de NPs. Estes dois tipos apenas diferiam no arranjo das moléculas do revestimento superficial. Estes investigadores observaram que essa alteração determinou que um dos tipos de NPs entrasse nas células e outro não, concluindo que a organização estrutural do revestimento das NPs assume um papel importante na regulação da permeação das NPs nas células (Verma *et al.*, 2008).

No entanto, as AuNPs testadas no presente trabalho de investigação têm cerca de 20 nm, nas microfotografias TEM conseguimos observar as AuNPs dentro de uma estrutura vesicular, podendo inferir-se que o seu mecanismo de internalização seja, provavelmente, por receptor que medeia a sua endocitose (RME).

A linha celular utilizada como modelo *in vitro*, para a realização dos ensaios laboratoriais, também é um factor determinante na internalização das AuNPs. Trabalhos realizados com diferentes linhas celulares, utilizando as mesmas AuNPs, demonstraram a internalização ou a não internalização das AuNPs dependente da linha celular em causa. Tkachenko e colaboradores testaram AuNPs esféricas de 22 nm, revestidas com vários ligandos (BSA, péptidos direccionados para diferentes receptores alvo da membrana citoplasmática e nuclear), na mesma concentração (150 pM) e com o mesmo tempo de incubação (3 horas). O único parâmetro alterado no decorrer do trabalho laboratorial foi o modelo celular utilizado (células HeLa, células de fibroblastoma de murganho 3T3/NIH e HepG2) e os revestimentos (proteína HIV Tat com o domínio PTD; péptido para receptor do adenovírus na membrana nuclear, entre outros, sendo todos os péptidos ligados previamente a BSA). Deste estudo comparativo de citotoxicidade e internalização das referidas AuNPs em diferentes linhas celulares, os cientistas concluíram que ocorria redução da viabilidade celular, em cerca de 20%, para as células HeLa, mas só de 5% quando o modelo celular utilizado era células 3T3/NIH. Em relação às células HepG2 não foi encontrada citotoxicidade. Todos os ensaios de viabilidade celular foram preconizados recorrendo ao ensaio de libertação da LDH. A internalização das AuNPs no citoplasma e núcleo das células era dependente do revestimento peptídico utilizado e do modelo celular utilizado (Tkachenko *et al.*, 2004). Das observações estes investigadores concluíram que os nanoconjugados de AuNPs não entram no núcleo das células 3T3/NIH nem

nas células HepG2. Concluíram, também, que a internalização dos conjugados AuNPs-péptidos é dependente da temperatura, o que sugere uma via de internalização por endocitose. As AuNPs funcionalizadas com um ligando específico para o receptor nuclear do adenovírus e para um domínio da integrina também são internalizadas nas células por um mecanismo dependente de energia, verificando-se, neste caso, entrada das AuNPs nas células HeLa e HepG2. A entrada das AuNPs revestidas de péptidos nas células HepG2 depende da sequência de aminoácidos do péptido e diferentes linhas celulares têm diferentes receptores ao nível da sua membrana citoplasmática e nuclear (Tkachenko *et al.*, 2004).

Para verificar se a internalização das AuNPs de citrato, MUA, CALND e CALNS ocorre por uma via RME, seria necessário executar ensaios complementares. Um dos ensaios mais utilizados pelos investigadores que estudam a entrada de AuNPs nas células consiste na sua incubação com AuNPs à temperatura de 37°C na estufa. Em simultâneo, para efeitos comparativos, devem ser executados ensaios nos mesmos moldes, mas à temperatura de -4 °C. Se ocorrer REM, para estas novas condições experimentais, a internalização das AuNPs poderia não ocorrer ou diminuiria drasticamente. Outros ensaios podiam ser feitos utilizando um meio hipertónico (adicionando sacarose ao meio) ou num meio sem a presença de ião potássio (K<sup>+</sup>). Se nos ensaios experimentais complementares, anteriormente mencionados, se verificar uma diminuição drástica da internalização das AuNPs, é provável que a sua via de entrada seja a endocitose mediada pela clatrina (*vide* Introdução, secção 6) (Chithrani e Chan, 2007).

Um aspecto importante a referir é o facto de as soluções diluídas dos diferentes tipos de AuNPs utilizadas neste trabalho de investigação, terem sido preparadas com meio MEM- $\alpha$  suplementado com FBS. Assim, é expectável que as AuNPs estejam revestidas com proteínas existentes no FBS. A internalização destas AuNPs nas células HepG2 está relacionada, muito provavelmente, com receptores existentes na membrana citoplasmática das células HepG2 para estas proteínas. Seria também útil realizar ensaios de incubação das células HepG2 com soluções dos diferentes tipos de AuNPs preparadas com MEM- $\alpha$  mas sem FBS. Nestas circunstâncias, poderíamos comparar os resultados obtidos nos dois ensaios experimentais, para verificar se as proteínas provenientes do meio MEM- $\alpha$  com FBS, que possam ter revestido parcialmente a superfície das AuNPs, facilitam a entrada das mesmas nas células, o que será discutido com mais detalhe neste Capítulo (Alkilany, *et al.*, 2009; Tkachenko *et al.*, 2003; Tkachenko *et al.* 2004; Stone *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2008).

Embora as microfotografias TEM apresentadas nesta dissertação não mostrem evidências de localização de AuNPs dispersas no citoplasma nem no núcleo, houve já trabalhos que descreveram a modificação de AuNPs no sentido de adquirirem a capacidade de estarem livres no citoplasma e de penetrarem no núcleo das células HeLa. Estas AuNPs, com 16 nm de diâmetro, foram funcionalizadas com péptidos (CPPs, *cell penetrating peptides*) para os quais existiam receptores a nível da membrana das células, que permitiam a sua internalização através dos péptidos que asseguravam o seu reconhecimento e entrada no núcleo (Nativo *et al.*, 2008).

Outro grupo de investigação, coordenado por Tsoi, publicou um estudo em 2005, que referia a entrada de AuNPs no núcleo (taxas de internalização da ordem dos 25 %) e ligação ao DNA das células. As AuNPs testadas não tinham nenhuma funcionalização específica superficial. No entanto, estas AuNPs tinham tamanhos muito pequenos, diâmetro de 1,4 nm, ou seja, tamanhos muito inferiores às AuNPs utilizadas neste estudo. Por outro lado, a linha celular que serviu de modelo a estes estudos não era a HepG2, mas células de metástases de melanoma (Tsoi *et al.*, 2005).

Num outro estudo, em que foram utilizadas AuNPs apenas revestidas com citrato, de tamanhos muito inferiores (5 nm) às AuNPs utilizadas neste estudo (20 nm), tendo como modelo células HeLa, também foi reportada a internalização das AuNPs no núcleo numa taxa de 25%. Quando estas mesmas AuNPs eram revestidas com um péptido específico para a entrada no núcleo, a taxa de internalização das AuNPs nesse organelo duplicava (Ryan *et al.*, 2007).

Face ao exposto, as observações das microfotografias TEM das células HepG2 incubadas durante 24 horas, com soluções de AuNPs na concentração de 100  $\mu\text{M}$ , parecem estar de acordo com as descrições de trabalhos efectuados por outros investigadores com outros tipos de AuNPs.

## **2.2. Internalização dos diferentes tipos de AuNPs avaliada por EAA/AE**

Com o objectivo de fazer uma análise comparativa da internalização dos diferentes tipos de AuNPs (AuNPs de citrato, MUA, CALND e CALNS), incubaram-se as células HepG2 com diferentes concentrações de soluções das referidas AuNPs (10, 30, 100 e 200  $\mu\text{M}$ ).

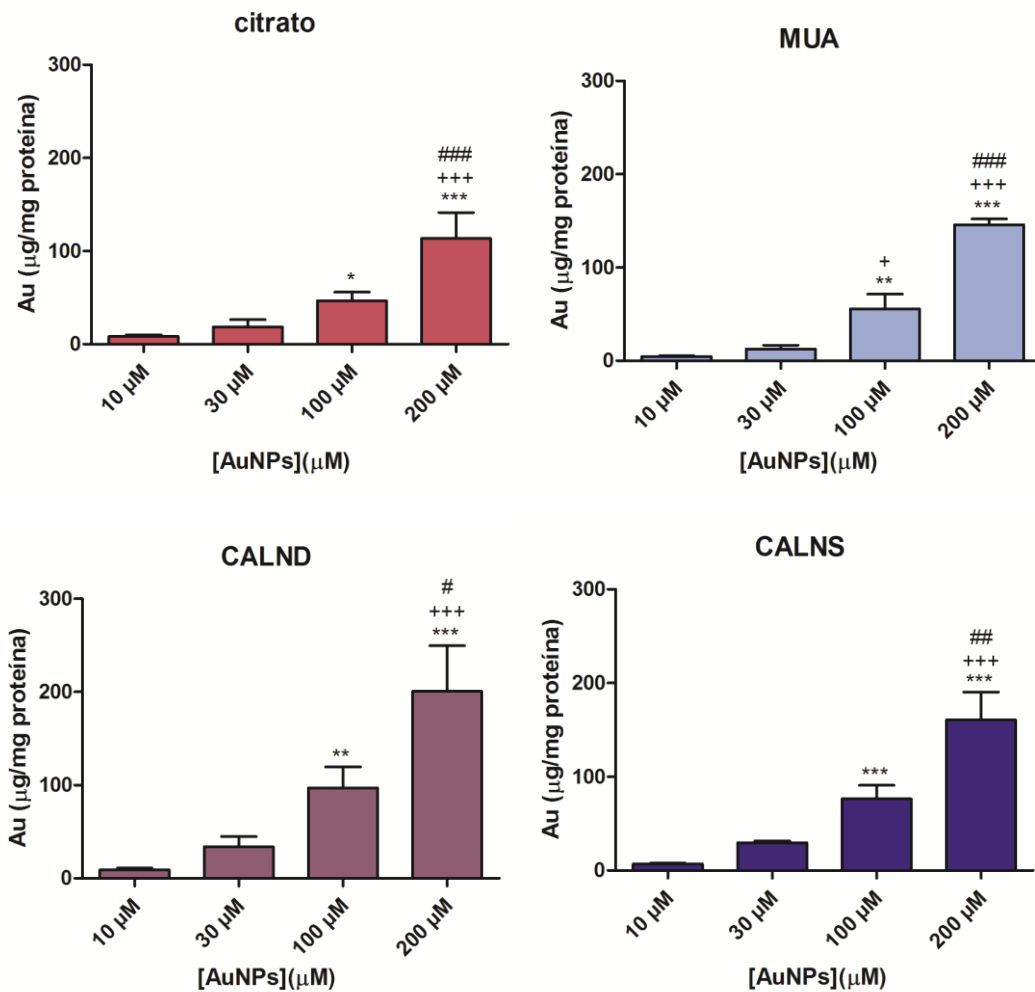
A avaliação da internalização das AuNPs foi realizada pela determinação quantitativa do Au coloidal encontrado dentro das células, recorrendo à técnica de análise elementar do Au por EAA/AE.

A opção pelo doseamento do Au dentro das células assenta no facto de as AuNPs utilizadas neste trabalho terem o núcleo (*core*) de Au, elemento que não ocorre naturalmente nas células. Embora tenham sido funcionalizadas com os revestimentos citrato, MUA, CALND e CALNS, a quantidade de Au em todas as AuNPs testadas é a mesma.

Os resultados dos ensaios experimentais realizados para determinação da quantidade de Au internalizado nas células HepG2 estão expressos nos gráficos das Figuras 44 e 45.

Os gráficos da Figura 44 expressam os resultados relativos ao doseamento do Au intracelular para cada uma das concentrações de AuNPs testadas, correspondendo cada gráfico a um tipo de AuNPs. A análise e interpretação destes resultados permitem verificar que, para todos os tipos de AuNPs, a quantidade de Au internalizado aumenta em função das concentrações das soluções de AuNPs a que as células HepG2 são expostas. Verifica-se, ainda, que a quantidade de Au internalizado, além de aumentar em função das concentrações das soluções de AuNPs, varia também em função do revestimento utilizado na funcionalização das diferentes AuNPs. Os resultados expressos nos gráficos evidenciam valores mais elevados de Au internalizado para as AuNPs CALND para as soluções de concentração de 30, 100 e 200  $\mu\text{M}$ . A interpretação destes resultados permite inferir que as AuNPs CALND são as que entram em maior quantidade nas células HepG2.

Da análise comparativa dos resultados expressos no gráfico da Figura 44, relativos ao doseamento do Au internalizado nas células HepG2, em função das concentrações das soluções dos 4 tipos de AuNPs a que as células foram expostas, verifica-se que, para as concentrações 10 e 30  $\mu\text{M}$ , os valores de Au doseados dentro das células são baixos para todos os tipos de AuNPs, embora para a concentração de 30  $\mu\text{M}$  se destaque já como mais elevado o valor de Au correspondente às AuNPs CALND. Para as concentrações de 100 e 200  $\mu\text{M}$ , verifica-se um aumento crescente dos valores de Au internalizado, correspondendo os valores mais baixos às AuNPs de citrato, seguindo-se, por ordem crescente, as AuNPs MUA, AuNPs CALNS e CALND.

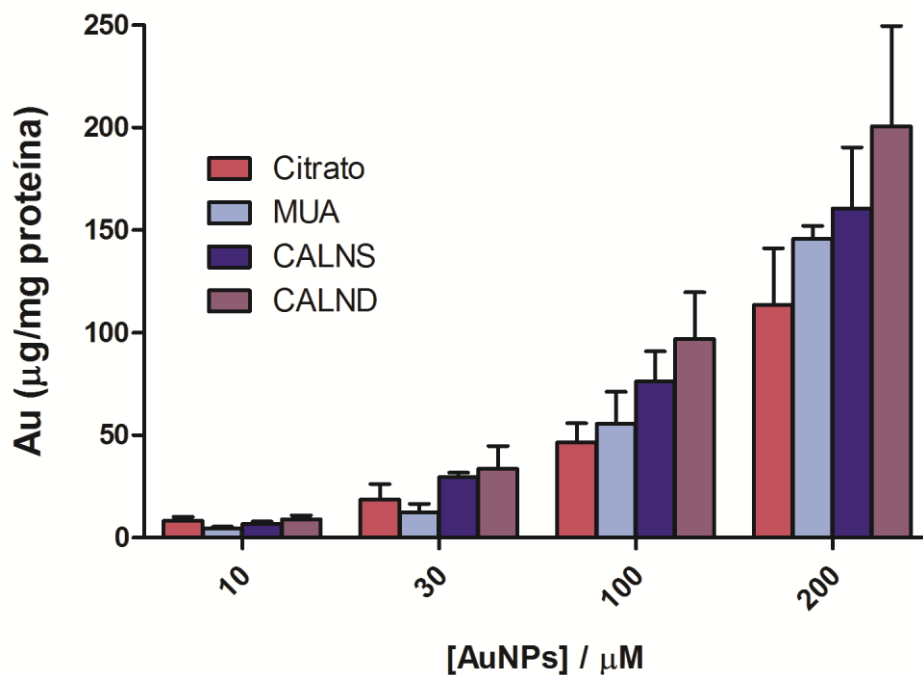


**Figura 44** – Quantidade de Au coloidal internalizado em células HepG2 ( $\mu\text{g}$  de Au/mg de proteína), determinada por EAA/AE, após 24 horas de incubação de células HepG2, com soluções de diferentes concentrações de AuNPs citrato, AuNPs MUA, AuNPs CALND e AuNPs CALNS.

(\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , 10  $\mu\text{M}$  vs. 30, 100 e 200  $\mu\text{M}$ ; +  $p < 0,05$ , ++  $p < 0,01$ , +++  $p < 0,001$ , 30  $\mu\text{M}$  vs 100 e 200  $\mu\text{M}$ ; #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$ , ###  $p < 0,001$ , 100  $\mu\text{M}$  vs. 200  $\mu\text{M}$ ).

Neste contexto, pode-se inferir-se que as AuNPs funcionalizadas com pentapéptidos são as que entram com mais facilidade nas células, sendo as AuNPs funcionalizadas com o pentapéptido CALND as mais internalizadas.

Estes resultados estão em consonância com as observações feitas com base nas microfotografias obtidas pela técnica TEM, para avaliação qualitativa da internalização das AuNPs.



**Figura 45**– Quantidade de Au coloidal internalizado em células HepG2 ( $\mu\text{g}$  de Au/mg de proteína), determinada por EAA/AE, após 24 horas de incubação de células HepG2 com soluções de diferentes concentrações de AuNPs citrato, AuNPs MUA, AuNPs CALND e AuNPs CALNS.

Na opinião de alguns investigadores, a internalização das AuNPs parece ser dependente do seu tamanho (Arnida e Ghandehari, 2009; Alkilany e Murphy, 2010), defendendo que deve existir um tamanho ideal para que as AuNPs sejam internalizadas. Estas opiniões baseiam-se no efeito designado por “*wrapping effect*” (efeito de envolvimento), que descreve o modo como a membrana citoplasmática das células rodeia as AuNPs. Estes investigadores pensam que a taxa de internalização das AuNPs está relacionada com o diâmetro do seu núcleo e não com o seu diâmetro hidrodinâmico, resultante das moléculas de revestimento e das moléculas de solvatação do veículo (moléculas de água, proteínas), onde estão dispersas (Arnida e Ghandehari, 2009).

Contudo, apesar do diâmetro do núcleo metálico de Au das AuNPs testadas neste estudo ser igual para todos os tipos, as taxas de internalização dos diferentes tipos de AuNPs nas células HepG2 apresentam valores diferentes (Figuras 44 e 45). Neste caso, não parece ser o tamanho das AuNPs o factor responsável pelas diferenças observadas nos valores de Au encontrado no interior das células HepG2, ou seja nas taxas de internalização dos quatro tipos de AuNPs, mas sim os seus revestimentos (citrato, MUA, CALND e CALNS).

Gao e colaboradores referem no seu trabalho dois factores que determinam o modo, o tempo e o número de AuNPs que entram nas células por endocitose. O primeiro factor está relacionado com a energia livre resultante da ligação entre o revestimento da AuNP e o receptor da membrana plasmática da célula, o segundo factor está relacionado com a cinética de regresso do receptor à membrana plasmática para estabelecer uma nova ligação. Considerando a contribuição destes factores e recorrendo a cálculos matemáticos, Gao e colaboradores (2005), sugeriram que as NPs com tamanhos da ordem dos 27-30 nm de diâmetro, têm o tempo de internalização mais rápido por via de um receptor que medeia a sua endocitose (RME) (Gao *et al.*, 2005; Alkilany e Murphy, 2010).

Um dos objectivos deste estudo era verificar se a internalização das AuNPs de citrato, MUA, CALND e CALNS, estava relacionada com o seu revestimento.

Recorde-se que as soluções das diferentes concentrações de AuNPs a que se expuseram as células HepG2 foram preparadas com meio MEM- $\alpha$  suplementado com 10% de FBS. Nestas circunstâncias, pensa-se que as proteínas contidas no meio de cultura das células HepG2 suplementado com 10% de FBS, são adsorvidas à superfície das AuNPs. Muitos investigadores acreditam que este fenómeno de adsorção das proteínas do meio de cultura das células à superfície das AuNPs é um possível mecanismo de internalização, mediado por um receptor específico para as proteínas do meio de cultura que revestem as AuNPs (RME), esquematizado na Figura 47 (Alkilany *et al.*, 2009; Tkachenko *et al.*, 2003; Tkachenko *et al.* 2004; Stone *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2008).

A ligação dessas proteínas às AuNPs impede a agregação das AuNPs, mantendo as distâncias relativas entre elas. No entanto, a superfície das AuNPs não fica totalmente revestida com as proteínas existentes no FBS (Figura 46), uma vez que a percentagem de FBS adicionado ao meio de cultura das células é apenas de 10% (Stone *et al.*, 2009). Por outro lado, a adsorção das proteínas existentes no meio de cultura, principalmente as proteínas do suplemento FBS, à superfície das AuNPs faz com que a carga dos diferentes tipos de AuNPs seja a mesma. Convém referir que as AuNPs utilizadas neste estudo tinham carga negativa e que a diferença entre as cargas dos revestimentos não era significativa (*vide* Capítulo II, secção 5.) (Alkilany *et al.*, 2009).

Em suma, atendendo às características físico-químicas das AuNPs utilizadas nos ensaios experimentais realizados neste estudo, pode inferir-se, que a sua entrada nas células está relacionada com o seu revestimento.



Estes resultados são concordantes com os de outros investigadores que também atribuem a maior ou menor internalização de AuNPs nas células à sua funcionalização com diferentes compostos, tais como polietilenoglicol (PEG), brometo de cetiltrimetilamónio (CTAB), ácido poliacrílico (PAA), cloridrato de polialilamina (PAH), ácido cítrico (Arnida e Ghandehari, 2009; Alkilany *et al.*, 2009; Chithrani *et al.*, 2006).

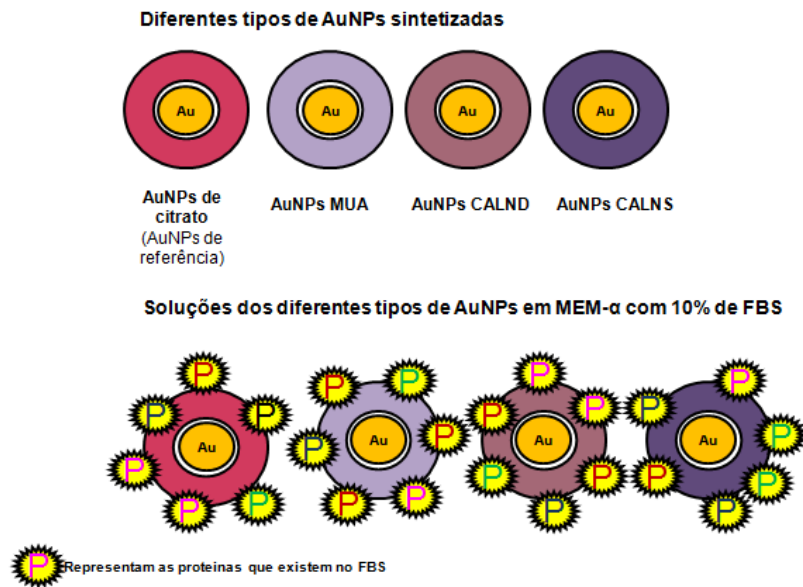
As Figuras 46 e 47, procuram ilustrar, de forma esquemática, o que acontece com as AuNPs, utilizadas neste trabalho de investigação, quando são preparadas as soluções em meio MEM- $\alpha$ , suplementado com FBS. Este suplemento tem proteínas na sua constituição, representadas nos esquemas das Figuras 46 e 47, pelo símbolo



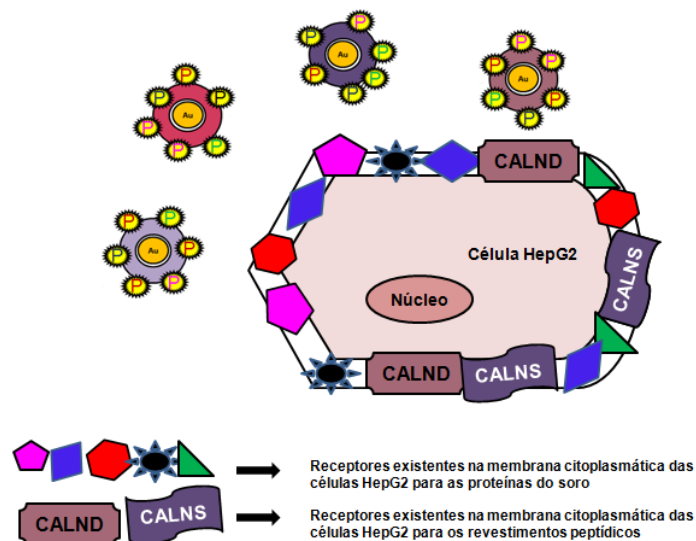
Na Figura 47 representa-se uma célula HepG2 com destaque para os receptores específicos da sua membrana plasmática para as proteínas do soro (FBS) e para os pentapéptidos CALND e CALNS, rodeada por AuNPs, uma de cada tipo. Da análise do esquema percebe-se que as AuNPs revestidas com os pentapéptidos CALND e CALNS, têm maior probabilidade de entrar na célula porque dispõem de maior número de receptores específicos na membrana plasmática da célula do que as AuNPs de citrato e MUA.

Sendo assim, as AuNPs revestidas com os pentapéptidos CALND e CALNS, apresentam as maiores taxas de internalização, provavelmente porque têm maiores possibilidades de estabelecer ligações entre as proteínas do soro (FBS), que as revestem de forma parcial, acrescidas das ligação que podem estabelecer entre os péptidos CALND e CALNS que revestem totalmente a sua superfície, como revestimento primário (Figura 47).

Neste contexto, parece ser lógico que os valores do Au internalizado, determinados para as AuNPs CALND e AuNPs CALNS sejam superiores aos valores encontrados para as AuNPs de citrato e AuNPs MUA.



**Figura 46** – Esquema dos quatro tipos de AuNPs, (AuNPs de citrato, MUA, CALND e CALNS), antes e depois de se colocarem em MEM- $\alpha$  com 10% de FBS).



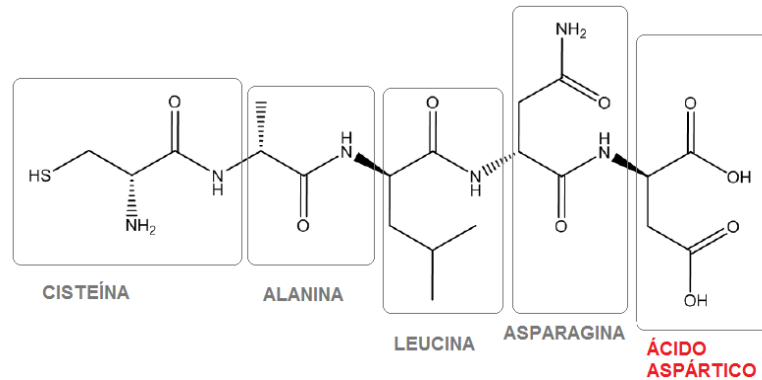
**Figura 47** – Esquema de AuNPs esféricas com proteínas do FBS adsorvidas à sua superfície. Esquema de uma célula HepG2 com os diferentes receptores específicos na membrana, para proteínas do FBS e para os péptidos CALND e CALNS.

No entanto, como justificar que os valores mais elevados de Au internalizados se tenham verificado para as AuNPs CALND?

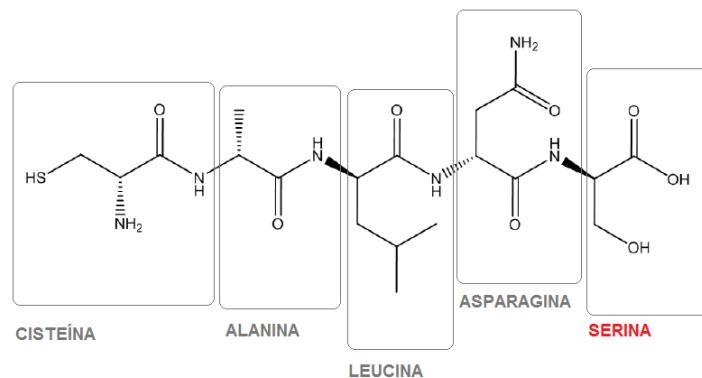
Comparando as fórmulas de estrutura dos dois pentapéptidos utilizados na funcionalização das AuNPs (Figuras 48 e 49) verifica-se que a sequência dos quatro aminoácidos iniciais CALN (Cisteína-Alanina-Leucina-Asparagina) é comum, diferindo

apenas no aminoácido terminal, podendo este ser um ácido aspártico (Asp), no caso do CALND, ou uma serina (Ser), no caso do CALNS (Soares, 2009).

Os revestimentos CALND e CALNS envolvem as AuNPs (*Self Assembled Monolayer* – SAM) conferindo-lhes propriedades químicas superficiais similares às proteínas.



**Figura 48** – Fórmula de estrutura do péptido CALND indicando a posição dos respectivos aminoácidos (adaptada de Soares, 2009).



**Figura 49** – Fórmula de estrutura do péptido CALNS indicando a posição dos respectivos aminoácidos (adaptada de Soares, 2009).

Diferindo apenas num aminoácido, a justificação dos valores de internalização das AuNPs CALND serem superiores aos valores de internalização das AuNPs CALNS pode residir no facto de existirem mais receptores específicos na membrana plasmática das células HepG2 para o pentapéptido CALND do que para o pentapéptido CALNS. No entanto, estudos conducentes à caracterização destes receptores são necessários para confirmar esta hipótese.



***IV - CONCLUSÕES***  
***PROJECTOS PARA O FUTURO***



## CONCLUSÕES

As conclusões que ressaltam dos resultados obtidos no estudo apresentado nesta dissertação, estão organizadas tendo em conta os objectivos que constituíram o fio condutor do seu desenvolvimento.

Para avaliar a citotoxicidade de AuNPs funcionalizadas com citrato, MUA, CALND e CALNS, numa linha celular de HepG2, foram realizados vários ensaios experimentais que obedeceram a métodos específicos, descritos na literatura da especialidade. Esses ensaios foram previamente testados e adaptados aos objectivos pretendidos. Assim, procedeu-se à cultura de células HepG2, consideradas pelos investigadores desta área, como entre as mais indicadas para estudo de citotoxicidade hepática, pelo facto de ser fácil a sua manutenção em cultura, serem estáveis e serem específicas de um órgão humano, o fígado. As AuNPs testadas têm o núcleo de Au, diâmetro aproximado de 20 nm, diferindo, apenas nos seus revestimentos. Nos ensaios de citotoxicidade as HepG2 foram expostas a soluções de diferentes concentrações de AuNPs, revestidas com citrato, MUA, CALND e CALNS, durante 6, 24, 48, 72 e 96 horas. Para avaliar a citotoxicidade das AuNPs testadas, foram realizados ensaios de redução do MTT e de libertação da LDH.

Para verificar se os meios de dispersão (veículos) das AuNPs utilizadas, são tóxicos para as células HepG2, foram simultaneamente realizados os mesmos ensaios, expondo células HepG2 aos meios de dispersão das AuNPs (sem AuNPs). Os resultados obtidos permitem concluir que os veículos dos diferentes tipos de AuNPs, nas concentrações testadas e para os mesmos tempos de exposição das HepG2, não evidenciaram sinais de citotoxicidade. É de salientar a importância que se deve atribuir aos ensaios experimentais realizados nas mesmas condições, expondo células HepG2 aos diferentes tipos de AuNPs e simultaneamente aos seus meios de dispersão. Deste modo, comparando os resultados relativos às situações experimentais descritas, pode concluir-se que os meios de dispersão das AuNPs não apresentam toxicidade para as HepG2.

Os resultados obtidos indicam que as AuNPs de citrato, MUA, CALND e CALNS e os respectivos veículos, não apresentam toxicidade para as células de hepatoma humano HepG2, nas condições experimentais descritas neste trabalho. Nesta perspectiva e, tendo em conta as conclusões referidas em estudos similares publicados, pensa-se que existe biocompatibilidade das AuNPs testadas para a linha celular HepG2.

No entanto, apesar de nos ensaios de citotoxicidade não se terem observado efeitos tóxicos destas AuNPs para o modelo celular testado, a observação de microfotografias TEM sugere que as AuNPs, na concentração de 100  $\mu\text{M}$ , colocadas em contacto com as células HepG2 por um período 24 horas, provocam algum dano e degenerescência celular, tanto de organelos como de membranas lipídicas. Como nas células controlo, não expostas a AuNPs, também se observaram alguns sinais de dano celular, não é seguro atribuir os danos observados nas microfotografias TEM às AuNPs, na concentração de 100  $\mu\text{M}$ . É indispensável realizar mais ensaios para aferir o protocolo experimental e afinar os procedimentos, para se confirmar se os danos encontrados nas células são provocados pelo seu contacto com as AuNPs e não pela técnica de preparação das amostras para a microscopia de transmissão electrónica (TEM).

Existem muitos estudos sobre internalização de AuNPs com formas, tamanhos e revestimentos diferentes, realizados em diversas linhas celulares. Esta diversidade de estudos dificulta, de certo modo, a comparação dos resultados apresentados por esses investigadores com os resultados a que foi possível chegar neste estudo. Neste contexto, o primeiro passo a dar neste domínio, consistiu em seleccionar as técnicas mais eficazes para determinação qualitativa e quantitativa do Au internalizados nas células HepG2, tendo-se optado pela técnica TEM (qualitativa) e pela técnica EAA/AE (quantitativa), descritas e aplicadas num grande número de investigações. O segundo passo foi dirigido no sentido de desenhar um protocolo que, depois de testado e afinado, permitisse verificar se a internalização dos diferentes tipos de AuNPs está relacionada com os seus revestimentos.

O terceiro passo consistiu na realização dos procedimentos laboratoriais de preparação das amostras de HepG2 para observação TEM e para análise do Au coloidal no interior das células por EAA/AE.

Os resultados obtidos mostram que as AuNPs internalizadas nas células HepG2, são encontradas dentro de vesículas, quer individualizadas quer em forma de aglomerados (observação de microfotografias TEM). Pensa-se que a internalização ocorre por um mecanismo endocítico mediado por um receptor (RME). No entanto, seriam necessários mais ensaios para confirmar esta hipótese. Verificam-se em todas as imagens TEM sinais de menor definição dos seus organelos, detritos celulares nos espaços extracelulares e algumas células com sinais de necrose, o que pode interpretar-se como indicadores de citotoxicidade. Conclui-se, pela observação das imagens TEM, que as AuNPs que entram nas HepG2 se localizam dentro de vesículas



(endossomas), não se observam isoladas no citoplasma, e não se visualizam dentro do núcleo.

Para obter resultados mais conclusivos sobre a influência dos revestimentos das AuNPs testadas, na sua internalização em HepG2, recorreu-se à técnica EAA/AE. Com base nesses resultados, foi possível inferir que as AuNPs funcionalizadas com os pentapéptidos CALND e CALNS apresentam maiores taxas de internalização nas células HepG2 do que as AuNPs de citrato e AuNPs MUA. Estas inferências verificam-se para todas as concentrações de AuNPs testadas, com maior expressão para as concentrações de 100 e 200  $\mu\text{M}$ . Assinale-se o facto, de serem as AuNPs CALND as que apresentam os valores de internalização mais elevados.



## PROJECTOS PARA O FUTURO

Os testes de viabilidade celular, efectuados, *in vitro*, nas células HepG2, ensaio do MTT e ensaio de libertação da LDH, conduziram à conclusão de que as AuNPs testadas não são citotóxicas nas condições estabelecidas neste trabalho de investigação.

Contudo, nem todos os efeitos tóxicos, que um determinado xenobiótico provoca, numa linha celular ou num sistema vivo, estão relacionados com a destruição da membrana citoplasmática das células ou com o comprometimento das funções das mitocôndrias. Assim, não pode ser descartada a hipótese de que existem efeitos sub-letais das AuNPs nas células. Para avaliar estes efeitos existem ensaios citotoxicológicos já descritos e validados, nomeadamente o ensaio da glutathione (GSH), que permite detectar a ocorrência de *stress* oxidativo e o ensaio de peroxidação lipídica da membrana plasmática. Para avaliar este último parâmetro se pode ser utilizado o ensaio do ácido tiobarbitúrico (*thiobarbituric acid* – TBA) (Vandeputte *et al.*, 1994; Lewinski *et al.*, 2008).

As culturas de células em duas dimensões (2D), utilizadas neste estudo, não representam de forma adequada o que acontece nos tecidos *in vivo*. Os tecidos vivos são constituídos por células organizadas tridimensionalmente (3D), o que lhes permitem diferentes interações célula-célula e célula-matriz envolvente (matriz extracelular, proteínas e células vizinhas), assim como condições substancialmente diferentes de difusão/transporte.

Testar a citotoxicidade de AuNPs em culturas celulares 2D, não reflecte de forma precisa a sua toxicidade num organismo vivo. A equipa de Lee e seus colaboradores, 2009, para obterem informações mais precisas e detalhadas sobre as interações entre NPs e os tecidos, desenvolveram um sistema de teste toxicológico baseado numa cultura celular 3D, criando um modelo de referência a três dimensões de tecido hepático para aplicação nos testes *in vitro* (Lee *et al.*, 2009).

Podem encarar-se as culturas celulares a 3D como uma ponte entre as tradicionais culturas celulares a 2D e os ensaios *in vivo* (Lee *et al.*, 2009; Alkilany e Murphy, 2010). Estes cientistas começaram por preparar um modelo de tecido hepático 3D com as células HepG2, uma vez que o fígado é o órgão com maior acumulação de NPs (Gao *et al.*, 2004).

Um aspecto que parece prioritário é estipular um tipo de NPs consideradas como NPs padrão, e todos os ensaios desenvolvidos noutros tipos de NPs seriam estudos comparativos com este grupo de NPs. As AuNPs parecem apresentar as

características essenciais para serem as NPs de referência no futuro (Lewinski *et al.*, 2008). As AuNPs têm sido referidas na literatura como indutoras de baixa toxicidade, quando se expõem diferentes linhas celulares a concentrações de AuNPs até 200  $\mu\text{M}$  em Au (AuNPs com distintos revestimentos) (Fu *et al.*, 2005; Shenoy *et al.*, 2006; Salem *et al.*, 2003; Su *et al.*, 2007).

Todavia, para que as AuNPs sejam consideradas como NPs padrão, torna-se indispensável a realização de muitos testes envolvendo, de forma estruturada e coordenada, vários grupos de investigação.

Uma proposta para uma futura investigação seria testar AuNPs numa linha celular de macrófagos humanos para comparar os resultados com os obtidos neste estudo com HepG2. Neste caso concreto, seria interessante e útil testar a geração de ROS, pesquisa e caracterização do aumento da expressão de genes pró-inflamatórios, como o TNF- $\alpha$ . Para avaliar a genotoxicidade das AuNPs, os macrófagos não são uma linha celular de eleição (Stone *et al.*, 2009), mas, para esse efeito poder-se-ia utilizar uma linha epitelial pulmonar, realizando ensaios como o ensaio COMETA e o ensaio do micronúcleo. Ambos os ensaios são relativamente fáceis de executar, permitindo a detecção do dano global do DNA e de mutações ao nível dos cromossomas e do genoma. Estes ensaios também podem ser, no futuro, aplicados *in vivo*.

Um processo inflamatório é outro efeito citotóxico sub-letal que AuNPs podem provocar nas células. Para avaliar este tipo de efeitos são pesquisadas citocinas pró-inflamatórias ou proteínas sinalizadoras de resposta inflamatória, nomeadamente IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e a IL-8, nas amostras de células utilizadas. Estas citocinas são detectadas utilizando o ensaio imunoenzimático ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*). Também seria interessante determinar a potencial genotoxicidade das AuNPs, examinando a extensão de dano do DNA por recurso a vários métodos, tais como a citometria de fluxo que permite, igualmente, a distinção de células apoptóticas e necróticas, e o ensaio COMETA. Este ensaio é utilizado para detectar dano no DNA de células individuais utilizando a técnica de electroforese em gel. As células com danos no DNA aparecem como se fossem “cometas” com o DNA intacto na “cabeça do cometa” e com as fracções de DNA danificado, com diferentes graus de migração no gel de electroforese, formando a “cauda do cometa”. É utilizado um corante específico do DNA, iodeto de propídeo, para se efectuarem as leituras no gel de electroforese. A quantidade de DNA danificado é proporcional ao DNA que forma a cauda do “cometa”. Outro ensaio que poderia ser desenvolvido nestas AuNPs seria um estudo toxicogenómico preliminar com micromatrizes de DNA, que determina especificamente quais os genes que estão a ser expressos com mais intensidade ou

quais os que têm a expressão diminuída, após a exposição às AuNPs (Lewinski *et al.*, 2008).

Uma outra preocupação prende-se com a possibilidade destes nanomateriais poderem apresentar um risco para a saúde, o que implica a necessidade de verificar como se metabolizam as AuNPs e avaliar a reacção das células quando expostas a esses metabolitos. Os compostos resultantes da degradação das AuNPs podem acumular-se nas células e provocar alterações intracelulares, nomeadamente a ruptura da membrana dos organelos ou alterações genéticas. Neste contexto, é necessário avaliar os efeitos decorrentes de exposições repetidas do organismo ou sistema biológico a AuNPs e determinar a extensão da sua eliminação e da sua bioacumulação (Lewinski *et al.*, 2008).



***V - BIBLIOGRAFIA***





## BIBLIOGRAFIA

Aillon KL, Xie Y, El-Gendy N, Berklund CJ, Forrest ML. Effects of nanomaterial physicochemical properties on in vivo toxicity. *Adv Drug Deliv Rev.* 2009 Jun 21; 61(6):457-66.

Alberola AP, Radler JO. The defined presentation of nanoparticles to cells and their surface controlled uptake. *Biomaterials.* 2009 Aug; 30(22):3766-70.

Alkilany AM, Murphy CJ. Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: what we have learned so far? *J Nanoparticle Res.* 2010; 12(7):2313-2333.

Alkilany AM, Nagaria PK, Hexel CR, Shaw TJ, Murphy CJ, Wyatt MD. Cellular uptake and cytotoxicity of gold nanorods: molecular origin of cytotoxicity and surface effects. *Small.* 2009 Mar; 5(6):701-8.

Alkilany AM, Nagaria PK, Wyatt MD, Murphy CJ. Cation exchange on the surface of gold nanorods with a polymerizable surfactant: polymerization, stability, and toxicity evaluation. *Langmuir.* Jun 15; 26(12):9328-33.

Al-Qadi S and Remuñan-López C Nanopartículas Metálicas: oro. Real Academia Nacional de Farmacia (RNAF), Monografía 28: Nanotecnología, 2009. p. 223-248.

Andrews GA, Root SW, Kniseley RM, Kerman HD. Intracavitary use of colloidal radioactive gold. *Radiology.* 1953 Dec; 61(6):922-9.

Ashamalla H, Rafla S, Zaki B, Ikoro NC, Ross P. Radioactive gold grain implants in recurrent and locally advanced head-and-neck cancers. *Brachytherapy.* 2002; 1(3):161-6.

Astruc D, Daniel MC, Ruiz J. Dendrimers and gold nanoparticles as exo-receptors sensing biologically important anions. *Chem Commun (Camb).* 2004 Dec 7(23):2637-49.

Bailey, H. L. Liber, *Cancer Lett.* 2007, 250, 63.

Berners-Price SJ, Girard GR, Hill DT, Sutton BM, Jarrett PS, Faucette LF, et al. Cytotoxicity and antitumor activity of some tetrahedral bis(diphosphino)gold(I) chelates. *J Med Chem.* 1990 May; 33(5):1386-92.

Berners-Price SJ, Sadler PJ. Interaction of the antitumor Au(I) complex [Au(Ph<sub>2</sub>P(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>PPh<sub>2</sub>)<sub>2</sub>]Cl with human blood plasma, red cells, and lipoproteins: <sup>31</sup>P and <sup>1</sup>H NMR studies. *J Inorg Biochem.* 1987 Dec; 31(4):267-81.

Berridge MV, Herst PM, Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev.* 2005; 11:127-52.

Bhattacharya R, Mukherjee P. Biological properties of "naked" metal nanoparticles. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008 Aug 17; 60(11):1289-306.

Bhumkar DR, Joshi HM, Sastry M, Pokharkar VB. Chitosan reduced gold nanoparticles as novel carriers for transmucosal delivery of insulin. *Pharm Res.* 2007 Aug; 24(8):1415-26.

Boisselier E, Astruc D. Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity. *Chem Soc Rev.* 2009 Jun;38(6):1759-82.

Borm PJ, Robbins D, Haubold S, Kuhlbusch T, Fissan H, Donaldson K, et al. The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC. Part Fibre Toxicol. 2006; 3:11.

Brewer SH, Glomm WR, Johnson MC, Knag MK, Franzen S. Probing BSA binding to citrate-coated gold nanoparticles and surfaces. *Langmuir.* 2005 Sep 27; 21(20):9303-7.

British Standards Institution (2007). Terminology for nanomaterials. PAS 136.BSI, London.

Brown CL, Whitehouse MW, Tiekink ER, Bushell GR. Colloidal metallic gold is not bio-inert. *Inflammopharmacology.* 2008 Jun; 16(3):133-7.

Brust M, Walker M, Bethell D, Schiffrin DJ, Whyman R. Synthesis of thiol-derivatized gold nanoparticles in a 2-phase liquid-liquid system. *J Chem Soc, Chem Commun.* 1994:801-802.

Burda C, Chen X, Narayanan R, El-Sayed MA. Chemistry and properties of nanocrystals of different shapes. *Chem Rev.* 2005 Apr; 105(4):1025-102.

Butler EB, Scardino PT, Teh BS, Uhl BM, Guerriero WG, Carlton CE, et al. The Baylor College of Medicine experience with gold seed implantation. *Semin Surg Oncol*. 1997 Nov-Dec; 13(6):406-18.

Cai W, Gao T, Hong H, Sun J. Applications of gold nanoparticles in cancer nanotechnology (Review). *Nanotechnology, science and applications*. 2008; 1: 17-32.

Cedervall T, Lynch I, Lindman S, Berggard T, Thulin E, Nilsson H, et al. Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Feb 13; 104(7):2050-5.

Chan WC. Bionanotechnology progress and advances. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2006 Jan; 12(1 Suppl 1):87-91.

Chen PC, Mwakwari SC, Oyelere AK. Gold nanoparticles: From nanomedicine to nanosensing (Review). *Nanotechnology, science and applications*. 2008; 1:45-66.

Chen Y, McMillan-Ward E, Kong J, Israels SJ, Gibson SB. Oxidative stress induces autophagic cell death independent of apoptosis in transformed and cancer cells. *Cell Death Differ*. 2008 Jan; 15(1):171-82.

Chithrani BD, Chan WC. Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes. *Nano Lett*. 2007 Jun; 7(6):1542-50.

Chithrani BD, Ghazani AA, Chan WC. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano Lett*. 2006 Apr; 6(4):662-8.

Conner SD, Schmid SL. Regulated portals of entry into the cell. *Nature*. 2003 Mar 6; 422(6927):37-44.

Connor EE, Mwamuka J, Gole A, Murphy CJ, Wyatt MD. Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity. *Small*. 2005 Mar; 1(3):325-7.

Cuenca AG, Jiang H, Hochwald SN, Delano M, Cance WG, Grobmyer SR. Emerging implications of nanotechnology on cancer diagnostics and therapeutics. *Cancer*. 2006 Aug 1; 107(3):459-66.

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

Derfus AM, Chan WCW, Bhatia SN. Probing the cytotoxicity of semiconductor quantum dots. *Nano Lett.* 2004; 4(1):11–8.

Derfus AM, Chan WCW, Bhatia SN. Probing the cytotoxicity of semiconductor

Desai MP, Labhasetwar V, Walter E, Levy RJ, Amidon GL. The mechanism of uptake of biodegradable microparticles in Caco-2 cells is size dependent. *Pharm Res.* 1997 Nov; 14(11):1568-73.

Devalapally H, Chakilam A, Amiji MM. Role of nanotechnology in pharmaceutical product development. *J Pharm Sci.* 2007 Oct; 96(10):2547-65.

Dobrovolskaia MA, McNeil SE. Immunological properties of engineered nanomaterials. *Nat Nanotechnol.* 2007 Aug; 2(8):469-78.

Donaldson K *et al.*, Carbon nanotubes; a review of their properties in relation to pulmonary toxicology and workplace safety, *Toxicol. Sci.* 2004; 92, 5–22.

Donaldson K, Aitken R, Tran L, Stone V, Duffin R, Forrest G, et al. Carbon nanotubes: a review of their properties in relation to pulmonary toxicology and workplace safety. *Toxicol Sci.* 2006 Jul; 92(1):5-22.

Dumortier H, Lacotte S, Pastorin G, Marega R, Wu W, Bonifazi D, et al. Functionalized carbon nanotubes are non-cytotoxic and preserve the functionality of primary immune cells. *Nano Lett.* 2006 Jul; 6(7):1522-8.

Fadeel B, Garcia-Bennett AE. Better safe than sorry: Understanding the toxicological properties of inorganic nanoparticles manufactured for biomedical applications. *Adv Drug Deliv Rev.* Mar 8; 62(3):362-74.

Faulk and Taylor, 1971. W.P. Faulk and G.M. Taylor, An immunocolloidal method for the electron microscope. *Immunochemistry* 8 (1971), p. 1081.

Felson DT, Anderson JJ, Meenan RF. The comparative efficacy and toxicity of second-line drugs in rheumatoid arthritis. Results of two metaanalyses. *Arthritis Rheum.* 1990 Oct; 33(10):1449-61.

Foucaud L, Wilson MR, Brown DM, Stone V. Measurement of reactive species production by nanoparticles prepared in biologically relevant media. *Toxicol Lett.* 2007 Nov 1; 174(1-3):1-9.

Franca A, Pelaz B, Moros M, Sanchez-Espinel C, Hernandez A, Fernandez-Lopez C, et al. Sterilization matters: consequences of different sterilization techniques on gold nanoparticles. *Small.* Jan; 6(1):89-95.

Frens G. Controlled nucleation for regulation of particle-size in monodisperse gold suspensions. *Nature Phys Sci.* 1973; 241:20-22.

Fu W, Shenoy D, Li J, Crasto C, Jones G, Dimarzio C, Sridhar S, Amiji M. Biomedical applications of gold nanoparticles functionalized using hetero-bifunctional poly (ethylene glycol) spacer. *Mater Res Soc Symp Proc.* 2005; 845.

Gao H, Shi W, Freund LB. Mechanics of receptor-mediated endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Jul 5; 102(27):9469-74.

Gao X, Cui Y, Levenson RM, Chung LW, Nie S. In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots. *Nat Biotechnol.* 2004 Aug; 22(8):969-76.

Gearheart LA, Ploehn HJ, Murphy CJ. Oligonucleotide adsorption to gold nanoparticles: a surface-enhanced Raman spectroscopy study of intrinsically bent DNA. *J Phys Chem B.* 2001; 105(50):12609-12615.

Geiser M, Rothen-Rutishauser B, Kapp N, Schurch S, Kreyling W, Schulz H, et al. Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells. *Environ Health Perspect.* 2005 Nov; 113(11):1555-60.

Gielen M, Tiekink ERT. *Metallotherapeutic drugs and metal-based diagnostic agents: The use of metals in medicine.* Hoboken N.J. John Wiley and Sons. 2005

Giljohann DA, Seferos DS, Patel PC, Millstone JE, Rosi NL, Mirkin CA. Oligonucleotide loading determines cellular uptake of DNA-modified gold nanoparticles. *Nano Lett.* 2007 Dec; 7(12):3818-21.

Goodman CM, McCusker CD, Yilmaz T, Rotello VM. Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains. *Bioconjug Chem.* 2004 Jul-Aug; 15(4):897-900.

Grabar KC, Freeman RG, Hommer MB, Natan MJ. Preparation and characterization of Au colloid monolayers. *Anal Chem.* 1995;67:735-743.

Guerrero E, Muñoz-Márquez MA, García MA, Crespo P, Fernández-Pinel E, Hernando A, Fernández A. Surface plasmon resonance and magnetism of thiol-capped gold nanoparticles *Nanotechnology.* 2008; 19(17):175701.

Gunnarsdottir S, Rucki M, Elfarra AA. Novel glutathione-dependent thiopurine prodrugs: evidence for enhanced cytotoxicity in tumor cells and for decreased bone marrow toxicity in mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002 Apr; 301(1):77-86.

Haiduc I, Silvestru C. Rhodium, iridium, copper and gold antitumor organometallic compounds (review). *In Vivo.* 1989 Jul-Aug; 3(4):285-93.

Han G, Ghosh P, Rotello VM. Functionalized gold nanoparticles for drug delivery. *Nanomedicine (Lond).* 2007 Feb; 2(1):113-23.

Han G, Martin CT, Rotello VM. Stability of gold nanoparticle-bound DNA toward biological, physical, and chemical agents. *Chem Biol Drug Des.* 2006 Jan; 67(1):78-82.

Han G, You CC, Kim BJ, Turingan RS, Forbes NS, Martin CT, et al. Light-regulated release of DNA and its delivery to nuclei by means of photolabile gold nanoparticles. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2006 May 5; 45(19):3165-9.

Hauck TS, Ghazani AA, Chan WC. Assessing the effect of surface chemistry on gold nanorod uptake, toxicity, and gene expression in mammalian cells. *Small.* 2008 Jan; 4(1):153-9.

Higby GJ. Gold in medicine: a review of its use in the West before 1900. *Gold Bull.* 1982; 15: 130-140.

Higby GJ. Gold in medicine: a review of its use in the West before 1900. *Gold Bull.* 1982; 15(4):130-40.

Holsapple MP, Farland WH, Landry TD, Monteiro-Riviere NA, Carter JM, Walker NJ, et al. Research strategies for safety evaluation of nanomaterials, part II: toxicological and safety evaluation of nanomaterials, current challenges and data needs. *Toxicol Sci.* 2005 Nov; 88(1):12-7.

Hong R, Han G, Fernandez JM, Kim BJ, Forbes NS, Rotello VM. Glutathione-mediated delivery and release using monolayer protected nanoparticle carriers. *J Am Chem Soc.* 2006 Feb 1;128 (4): 1078-9.

[http://europeau/health/ph\\_risk/committees/04\\_scenih/ docs/](http://europeau/health/ph_risk/committees/04_scenih/ docs/) (acedido em Outubro 2009)

<http://www.lgcpromochem.com/atcc/> (acedido em Outubro 2009)

Huang X, El-Sayed IH, Qian W, El-Sayed MA. Cancer cell imaging and photothermal therapy in the near-infrared region by using gold nanorods. *J Am Chem Soc.* 2006 Feb 15; 128(6):2115-20.

Huang X, Jain PK, El-Sayed IH, El-Sayed MA. Determination of the minimum temperature required for selective photothermal destruction of cancer cells with the use of immunotargeted gold nanoparticles. *Photochem Photobiol.* 2006 Mar-Apr; 82(2):412-7.

Huang X, Jain PK, El-Sayed IH, El-Sayed MA. Gold nanoparticles: interesting optical properties and recent applications in cancer diagnostics and therapy. *Nanomedicine (Lond).* 2007 Oct; 2(5):681-93.

Huang X, Qian W, El-Sayed IH, El-Sayed MA. The potential use of the enhanced nonlinear properties of gold nanospheres in photothermal cancer therapy. *Lasers Surg Med.* 2007 Oct; 39(9):747-53.

Jafari T, Simchi A, Khakpash N. Synthesis and cytotoxicity assessment of superparamagnetic iron-gold core-shell nanoparticles coated with polyglycerol. *J Colloid Interface Sci.* May 1; 345(1):64-71.

Jain PK, El-Sayed IH, El-Sayed MA. Au nanoparticles target cancer. *Nano Today.* 2007; 2(2):16.

Jain PK, Huang X, El-Sayed IH, El-Sayed MA. Noble metals on the nanoscale: optical and photothermal properties and some applications in imaging, sensing, biology, and medicine. *Acc Chem Res.* 2008 Dec; 41(12):1578-86.

Jain PK, Lee KS, El-Sayed IH, El-Sayed MA. Calculated absorption and scattering properties of gold nanoparticles of different size, shape, and composition: applications in biological imaging and biomedicine. *J Phys Chem B.* 2006 Apr 13; 110(14):7238-48.

Jia HY, Liu Y, Zhang XJ, Han L, Du LB, Tian Q, et al. Potential oxidative stress of gold nanoparticles by induced-NO releasing in serum. *J Am Chem Soc.* 2009 Jan 14; 131(1):40-1.

Jiang W, Kim BY, Rutka JT, Chan WC. Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent. *Nat Nanotechnol.* 2008 Mar; 3(3):145-50.

Johnston HJ, Hutchison G, Christensen FM, Peters S, Hankin S, Stone V. A review of the in vivo and in vitro toxicity of silver and gold particulates: particle attributes and biological mechanisms responsible for the observed toxicity. *Crit Rev Toxicol.* Apr; 40(4):328-46.

Johnston HJ, Semmler-Behnke M, Brown DM, Kreyling W, Tran L, Stone V. Evaluating the uptake and intracellular fate of polystyrene nanoparticles by primary and hepatocyte cell lines in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol.* Jan 1; 242(1):66-78.

Joshi HM, Bhumkar DR, Joshi K, Pokharkar V, Sastry M. Gold nanoparticles as carriers for efficient transmucosal insulin delivery. *Langmuir.* 2006 Jan 3;22(1):300-5.

Kahn RL. Serum Diagnosis for Syphilis. In *Colloid Chemistry*; Alexander, J., Ed.; The Chemical Catalog Co.: New York, 1928; Vol. II, p 757.



Kamat PV. Photophysical, Photochemical and Photocatalytic Aspects of Metal Nanoparticles. *J Phys Chem B*. 2002; 106:7729 – 7744.

Kawata K, Osawa M, Okabe S. In vitro toxicity of silver nanoparticles at noncytotoxic doses to HepG2 human hepatoma cells. *Environ Sci Technol*. 2009 Aug 1; 43(15):6046-51.

Khan JA, Pillai B, Das TK, Singh Y, Maiti S. Molecular effects of uptake of gold nanoparticles in HeLa cells. *Chembiochem*. 2007 Jul 23; 8(11):1237-40.

Kiffin R, Bandyopadhyay U, Cuervo AM. Oxidative stress and autophagy. *Antioxid Redox Signal*. 2006 Jan-Feb; 8(1-2):152-62.

Kimling J, Maier M, Okenve B, Kotaidis V, Ballot H, Plech A. Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited. *J Phys Chem B*. 2006 Aug 17; 110(32):15700-7.

Kogan MJ, Olmedo I, Hosta L, Guerrero AR, Cruz LJ, Albericio F. Peptides and metallic nanoparticles for biomedical applications. *Nanomedicine (Lond)*. 2007 Jun; 2(3):287-306.

Kroll A, Pillukat MH, Hahn D, Schnekenburger J. Current in vitro methods in nanoparticle risk assessment: limitations and challenges. *Eur J Pharm Biopharm*. 2009 Jun; 72(2):370-7.

Kunzmann A, Andersson B, Thurnherr T, Krug H, Scheynius A, Fadeel B. Toxicology of engineered nanomaterials: Focus on biocompatibility, biodistribution and biodegradation. *Biochim Biophys Acta*. May 8.

Lasagna-Reeves C, Gonzalez-Romero D, Barria MA, Olmedo I, Clos A, Sadagopa Ramanujam VM, et al. Bioaccumulation and toxicity of gold nanoparticles after repeated administration in mice. *Biochem Biophys Res Commun*. Mar 19; 393(4):649-55.

Lee J, Lilly GD, Doty RC, Podsiadlo P, Kotov NA. In vitro toxicity testing of nanoparticles in 3D cell culture. *Small*. 2009 May;5(10):1213-21.

Lewinski N, Colvin V, Drezek R. Cytotoxicity of nanoparticles. *Small*. 2008 Jan;4(1):26-49.

Li JJ, Hartono D, Ong CN, Bay BH, Yung LY. Autophagy and oxidative stress associated with gold nanoparticles. *Biomaterials*. Aug; 31(23):5996-6003.

Li JJ, Zou L, Hartono D, Ong C-N, Bay B-H, Yung L-YL. Gold Nanoparticles Induce Oxidative Damage in Lung Fibroblasts In Vitro. *Advanced Materials*. 2008 Jan; 20(1):138-142.

Liang M, Lin IC, Whittaker MR, Minchin RF, Monteiro MJ, Toth I. Cellular uptake of densely packed polymer coatings on gold nanoparticles. *ACS Nano*. Jan 26; 4(1):403-13.

Liang XJ, Chen C, Zhao Y, Jia L, Wang PC. Biopharmaceutics and therapeutic potential of engineered nanomaterials. *Curr Drug Metab*. 2008 Oct; 9(8):697-709.

Limbach LK, Li Y, Grass RN, Brunner TJ, Hintermann MA, Muller M, et al. Oxide nanoparticle uptake in human lung fibroblasts: effects of particle size, agglomeration, and diffusion at low concentrations. *Environ Sci Technol*. 2005 Dec 1; 39(23):9370-6.

Lin S, Tsai Y, Chen C, Lin C. Two-step functionalization of neutral and positively charged thiols onto citrate-stabilized Au nanoparticles. *J Phys Chem B*. 2004; 108:2134–2139.

Liu X, Atwater M, Wang J, Huo Q. Extinction coefficient of gold nanoparticles with different sizes and different capping ligands. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2007 Jul 1; 58(1):3-7.

Liu Y, Shipton MK, Ryan J, Kaufman ED, Franzen S, Feldheim DL. Synthesis, stability, and cellular internalization of gold nanoparticles containing mixed peptide-poly(ethylene glycol) monolayers. *Anal Chem*. 2007 Mar 15; 79(6):2221-9.

Liu Z, Davis C, Cai W, He L, Chen X, Dai H. Circulation and long-term fate of functionalized, biocompatible single-walled carbon nanotubes in mice probed by Raman spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Feb 5; 105(5):1410-5.

Long TC, Saleh N, Tilton RD, Lowry GV, Veronesi B. Titanium dioxide (P25) produces reactive oxygen species in immortalized brain microglia (BV2): implications for nanoparticle neurotoxicity. *Environ Sci Technol.* 2006 Jul 15; 40(14):4346-52.

Loo C, Lowery A, Halas N, West J, Drezek R. Immunotargeted nanoshells for integrated cancer imaging and therapy. *Nano Lett.* 2005 Apr; 5(4):709-11.

Love CS, Chechik V, Smith DK, Wilson K, Ashworth I, Brennan C. Synthesis of gold nanoparticles within a supramolecular gel-phase network. *Chem Commun (Camb).* 2005 Apr 21(15):1971-3.

Luccardini C, Yakovlev A, Gaillard S, van 't Hoff M, Alberola AP, Mallet JM, et al. Getting across the plasma membrane and beyond: intracellular uses of colloidal semiconductor nanocrystals. *J Biomed Biotechnol.* 2007; 2007(7):68963.

Lynch I, Cedervall T, Lundqvist M, Cabaleiro-Lago C, Linse S, Dawson KA. The nanoparticle-protein complex as a biological entity; a complex fluids and surface science challenge for the 21st century. *Adv Colloid Interface Sci.* 2007 Oct 31;134-135:167-74.

Mahdihassan S. Colloidal gold as an alchemical preparation. *Janus.* 1971; 58:112-8.

Mahdihassan S. Jade and gold originally as drugs in China. *Am J Chin Med.* 1981 Summer; 9(2):108-11.

Mahmood M, Casciano DA, Mocan T, Iancu C, Xu Y, Mocan L, et al. Cytotoxicity and biological effects of functional nanomaterials delivered to various cell lines. *J Appl Toxicol.* Jan; 30(1):74-83.

Marquis BJ, Love SA, Braun KL, Haynes CL. Analytical methods to assess nanoparticle toxicity. *Analyst.* 2009 Mar; 134(3):425-39.

Marshall NJ, Goodwin CJ, Holt SJ. A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function. *Growth Regul.* 1995 Jun; 5(2):69-84.

McIntosh CM, Esposito EA, 3rd, Boal AK, Simard JM, Martin CT, Rotello VM. Inhibition of DNA transcription using cationic mixed monolayer protected gold clusters. *J Am Chem Soc.* 2001 Aug 8;123 (31): 7626-9.

Medina C, Santos-Martinez MJ, Radomski A, Corrigan OI, Radomski MW. Nanoparticles: pharmacological and toxicological significance. *Br J Pharmacol.* 2007 Mar; 150(5):552-8.

Miller AD. Human gene therapy comes of age. *Nature.* 1992 Jun 11;357(6378):455-60.

Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC. Nanomedicine: current status and future prospects. *Faseb J.* 2005 Mar; 19(3):311-30.

Monteiro-Riviere NA and Tran CL *Nanotoxicology – Characterization, Dosing and Health Effects.* In: Edited by Nancy A. Monteiro – Riviere and C.Lang Tran, Iforma healthcare. New York. 2007.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983 Dec 16;65(1-2):55-63.

Mukherjee P, Bhattacharya R, Bone N, Lee YK, Patra CR, Wang S, et al. Potential therapeutic application of gold nanoparticles in B-chronic lymphocytic leukemia (BCLL): enhancing apoptosis. *J Nanobiotechnology.* 2007; 5:4.

Mulvaney P. Surface plasmon spectroscopy of nanosized metal particles. *Langmuir.* 1996; 12:788-798.

Murdock RC, Braydich-Stolle L, Schrand AM, Schlager JJ, Hussain SM. Characterization of nanomaterial dispersion in solution prior to in vitro exposure using dynamic light scattering technique. *Toxicol Sci.* 2008 Feb; 101(2):239-53.

Murthy SK. Nanoparticles in modern medicine: state of the art and future challenges. *Int J Nanomedicine.* 2007; 2(2):129-41.

Nagarajan R, Nanoparticles: Building Blocks for Nanotechnology. In: Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Passivation, and Functionalization, *Amer. Chem. Soc.* 2008, 996 (1), 2-14.

Nath N, Chilkoti A. Interfacial phase transition of an environmentally responsive elastin biopolymer adsorbed on functionalized gold nanoparticles studied by colloidal surface plasmon resonance. *J Am Chem Soc.* 2001 Aug 29; 123(34):8197-202.

Nativo P, Prior IA, Brust M. Uptake and intracellular fate of surface-modified gold nanoparticles. *ACS Nano.* 2008 Aug;2(8):1639-44.

Nel A, Xia T, Madler L, Li N. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science.* 2006 Feb 3; 311(5761):622-7.

Nemmar A, Hoet PH, Vanquickenborne B, Dinsdale D, Thomeer M, Hoylaerts MF, et al. Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans. *Circulation.* 2002 Jan 29; 105(4):411-4.

Niidome T, Yamagata M, Okamoto Y, Akiyama Y, Takahashi H, Kawano T, et al. PEG-modified gold nanorods with a stealth character for in vivo applications. *J Control Release.* 2006 Sep 12; 114(3):343-7.

Noor F, Niklas J, Muller-Vieira U, Heinzle E. An integrated approach to improved toxicity prediction for the safety assessment during preclinical drug development using Hep G2 cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2009 Jun 1; 237(2):221-31.

Oberdörster G, Stone V, Donaldson K. Toxicology of nanoparticles: a historical perspective. *Nanotoxicology.* 2007; 1:2–25.

Oberdörster G, Maynard A, Donaldson K, Castranova V, Fitzpatrick J, Ausman K, et al. Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. Part *Fibre Toxicol.* 2005 Oct 6; 2:8.

Oberdörster G, Oberdorster E, Oberdorster J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect.* 2005 Jul; 113(7):823-39.

Oberdörster G, Sharp Z, Atudorei V, Elder A, Gelein R, Lunts A, et al. Extrapulmonary translocation of ultrafine carbon particles following whole-body inhalation exposure of rats. *J Toxicol Environ Health A*. 2002 Oct 25; 65(20):1531-43.

O'Brien GA, Quinn AJ, Biancardo M, Preece JA, Bignozzi CA, Redmond G. Making electrical nanocontacts to nanocrystal assemblies: mapping of room-temperature Coulomb-blockade thresholds in arrays of 28-kDa gold nanocrystals. *Small*. 2006 Feb; 2(2):261-6.

O'Brien PJ, Irwin W, Diaz D, Howard-Cofield E, Krejsa CM, Slaughter MR, et al. High concordance of drug-induced human hepatotoxicity with in vitro cytotoxicity measured in a novel cell-based model using high content screening. *Arch Toxicol*. 2006 Sep; 80(9):580-604.

Ogawara K, Yoshida M, Higaki K, Kimura T, Shiraishi K, Nishikawa M, et al. Hepatic uptake of polystyrene microspheres in rats: effect of particle size on intrahepatic distribution. *J Control Release*. 1999 May 1; 59(1):15-22.

Ostrowski AD, Martin T, Conti J, Hurt I, Harthorn BH. Nanotoxicology: characterizing the scientific literature, 2000–2007. *J Nanoparticle Res*. 2008; 11(2):251-257.

Paciotti GF, Kingston DGI, Tamarkin L. Colloidal gold nanoparticles: a novel nanoparticle platform for developing multifunctional tumor-targeted drug delivery vectors. *Drug Dev Res*. 2006; 67:47-54.

Paciotti GF, Myer L, Weinreich D, Goia D, Pavel N, McLaughlin RE, et al. Colloidal gold: a novel nanoparticle vector for tumor directed drug delivery. *Drug Deliv*. 2004 May-Jun; 11(3):169-83.

Pan Y, Leifert A, Ruau D, Neuss S, Bornemann J, Schmid G, et al. Gold nanoparticles of diameter 1.4 nm trigger necrosis by oxidative stress and mitochondrial damage. *Small*. 2009 Sep; 5(18):2067-76.

Pan Y, Neuss S, Leifert A, Fischler M, Wen F, Simon U, et al. Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles. *Small*. 2007 Nov; 3(11):1941-9.

Patra HK, Banerjee S, Chaudhuri U, Lahiri P, Dasgupta AK. Cell selective response to gold nanoparticles. *Nanomedicine*. 2007 Jun; 3(2):111-9.

Pernodet N, Fang X, Sun Y, Bakhtina A, Ramakrishnan A, Sokolov J, et al. Adverse effects of citrate/gold nanoparticles on human dermal fibroblasts. *Small*. 2006 Jun; 2(6):766-73.

Poma A, Di Giorgio ML. Toxicogenomics to improve comprehension of the mechanisms underlying responses of in vitro and in vivo systems to nanomaterials: a review. *Curr Genomics*. 2008 Dec; 9(8):571-85.

Ponti J, Colognato R, Franchini F, Gioria S, Simonelli F, Kamel A, Rossi F. Uptake and cytotoxicity of gold nanoparticles in MDCK and HepG2 cell lines. 2008.

Porter D, Sriram K, Wolfarth M, Jefferson A, Schwegler-Berry D, Andrew ME, Castranova V. A biocompatible medium for nanoparticle dispersion. *Nanotoxicology*. 2008; 2:144–154.

Powers KW, Palazuelos M, Moudgil BM, Roberts SM. Characterization of the size, shape, and state of dispersion of nanoparticles for toxicological studies, *Nanotoxicology*. 2007; 1(1):42–51.

Powers, K.W., Palazuelos, M., Brown, S.C. and Roberts, S. M. (2009). Characterization of Nanomaterials for Toxicological Evaluation. In: *Nanotoxicity, From in vivo and in vitro Models to Health Risks*, pp. 1 – 27 (Edited by Sahu, S.C. and Casciano, D.A.), John Wiley & Sons Ltd, United Kingdom.

Richter V, Potthoff A, Pompe W, Gelinsky M, Ikonomidou H, Bastian S, Schirmer K, Scholz S, Hofinger J. BMBF-Project INOS-evaluation of health risks of nanoparticles-a contribution to a sustainable development of nanotechnology. *Euro Nano Forum*. 2007:145-147.

Rosi NL, Giljohann DA, Thaxton CS, Lytton-Jean AK, Han MS, Mirkin CA. Oligonucleotide-modified gold nanoparticles for intracellular gene regulation. *Science*. 2006 May 19; 312(5776):1027-30.

Rothen-Rutishauser BM, Schurch S, Haenni B, Kapp N, Gehr P. Interaction of fine particles and nanoparticles with red blood cells visualized with advanced microscopic techniques. *Environ Sci Technol.* 2006 Jul 15; 40(14):4353-9.

Royal Society and Royal Academy of Engineering, 2004

Ryan JA, Overton KW, Speight ME, Oldenburg CN, Loo L, Robarge W, et al. Cellular uptake of gold nanoparticles passivated with BSA-SV40 large T antigen conjugates. *Anal Chem.* 2007 Dec 1; 79(23):9150-9.

Sadauskas E, Wallin H, Stoltenberg M, Vogel U, Doering P, Larsen A, et al. Kupffer cells are central in the removal of nanoparticles from the organism. *Part Fibre Toxicol.* 2007; 4:10.

Salem Ak, Searson PC, Leong KW, *Nat. Mater.* 2003, 2,668–71.

Sandhu KK, McIntosh CM, Simard JM, Smith SW, Rotello VM. Gold nanoparticle-mediated transfection of mammalian cells. *Bioconjug Chem.* 2002 Jan-Feb;13(1):3-6.

Sayes CM, Gobin AM, Ausman KD, Mendez J, West JL, Colvin VL. Nano-C60 cytotoxicity is due to lipid peroxidation. *Biomaterials.* 2005 Dec; 26(36):7587-95.

SCENIHR. The appropriateness of existing methodologies to assess the potential risks associated with engineered and adventitious products of nanotechnologies. 2005. Disponível em: [http://europe.eu/health/ph\\_risk/committees/04\\_scenih/docs/\(accedido a:Outubro 2009\)](http://europe.eu/health/ph_risk/committees/04_scenih/docs/(accedido a:Outubro 2009)).

SCENIHR. The appropriateness of existing methodologies to assess the potential Scenih\_o\_007pdf (accedido a: Outubro 2009).

Schmid G. Large clusters and colloids - metals in the embryonic state. *Chem Rev.* 1992; 92:1709-1727.

Schulze C, Alexandra Kroll, Lehr C-M, Schäfer UF, Becker K, Schnekenburger J, Isfort CS, Landsiedel R, Wohlleben W. Not ready to use – overcoming pitfalls when dispersing nanoparticles in physiological media. *Nanotoxicology.* 2008; 2(2):51-61.



Selvakannan P, Mandal S, Phadtare S, Gole A, Pasricha R, Adyanthaya SD, et al. Water-dispersible tryptophan-protected gold nanoparticles prepared by the spontaneous reduction of aqueous chloroaurate ions by the amino acid. *J Colloid Interface Sci.* 2004 Jan 1; 269(1):97-102.

Shatkin JA. *Nanotechnology Health and Environmental Risks.* In: Taylor & Francis Group CRC Press. 1ª Edição. London; 2008. p . 1-159.

Shaw IC. Gold-based therapeutic agents. *Chem Rev.* 1999 Sep 8; 99(9):2589-600.

Shenoy D, Fu W, Li J, Crasto C, Jones G, DiMarzio C, et al. Surface functionalization of gold nanoparticles using hetero-bifunctional poly(ethylene glycol) spacer for intracellular tracking and delivery. *Int J Nanomedicine.* 2006; 1(1):51-7.

Shimmin RG, Schoch AB, Braun PV. Polymer size and concentration effects on the size of gold nanoparticles capped by polymeric thiols. *Langmuir.* 2004 Jun 22; 20(13):5613-20.

Shukla R, Bansal V, Chaudhary M, Basu A, Bhonde RR, Sastry M. Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: a microscopic overview. *Langmuir.* 2005 Nov 8;21(23):10644-54.

Sickafus, K. E., *Encyclopedia of Materials Characterization: Surfaces, Interfaces, Thin Films;* Brundle, R. C.; Evans, Jr. C. A.; Wilson, S., Maining Publications Co., U.S.A, 1992.

Singh S, D'Britto V, Prabhune AA, Ramana CV, Dhawan A, Prasad BLV. Cytotoxic and genotoxic assessment of glycolipid-reduced and-capped gold and silver nanoparticles. *New J Chem.* 2010; 34:294-301.

Sinha R, Kim GJ, Nie S, Shin DM. Nanotechnology in cancer therapeutics: bioconjugated nanoparticles for drug delivery. *Mol Cancer Ther.* 2006 Aug;5(8):1909-17.

Slater TF, Sawyer B, Straeuli U. Studies on Succinate-Tetrazolium Reductase Systems. Iii. Points of Coupling of Four Different Tetrazolium Salts. *Biochim Biophys Acta*. 1963 Nov 8; 77:383-93.

Soares L. Síntese e Funcionalização de Nanopartículas Metálicas com Péptidos. Faculdade de Ciências Universidade do Porto (FCUP). Dissertação de Mestrado. 2009. Outubro.

Sokolov K, Follen M, Aaron J, Pavlova I, Malpica A, Lotan R, et al. Real-time vital optical imaging of precancer using anti-epidermal growth factor receptor antibodies conjugated to gold nanoparticles. *Cancer Res*. 2003 May 1; 63(9):1999-2004.

Spielmann H, Hoffmann S, Liebsch M, Botham P, Fentem JH, Eskes C, et al. The ECVAM international validation study on in vitro tests for acute skin irritation: report on the validity of the EPISKIN and EpiDerm assays and on the Skin Integrity Function Test. *Altern Lab Anim*. 2007 Dec;35(6):559-601.

Stone V, Johnston H, Schins RP. Development of in vitro systems for nanotoxicology: methodological considerations. *Crit Rev Toxicol*. 2009;39(7):613-26.

Su CH, Sheu HS, Lin CY, Huang CC, Lo YW, Pu YC, et al. Nanoshell magnetic resonance imaging contrast agents. *J Am Chem Soc*. 2007 Feb 21;129(7):2139-46.

Sun L, Liu D, Wang Z. Functional gold nanoparticle-peptide complexes as cell-targeting agents. *Langmuir*. 2008 Sep 16; 24(18):10293-7.

Sun RW, Ma DL, Wong EL, Che CM. Some uses of transition metal complexes as anti-cancer and anti-HIV agents. *Dalton Trans*. 2007 Nov 21(43):4884-92.

Takahashi H, Niidome Y, Niidome T, Kaneko K, Kawasaki H, Yamada S. Modification of gold nanorods using phosphatidylcholine to reduce cytotoxicity. *Langmuir*. 2006 Jan 3; 22(1):2-5.

Taraska JW, Almers W. Bilayers merge even when exocytosis is transient. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Jun 8; 101(23):8780-5.

Teeguarden JG, Hinderliter PM, Orr G, Thrall BD, Pounds JG. Particokinetics in vitro: dosimetry considerations for in vitro nanoparticle toxicity assessments. *Toxicol Sci.* 2007 Feb;95(2):300-12.

Templeton AC, Wuelfing WP, Murray RW. Monolayer-protected cluster molecules. *Acc Chem Res.* 2000 Jan; 33(1):27-36.

Terentyuk GS, Maslyakova GN, Suleymanova LV, Khlebtsov BN, Kogan BY, Akchurin GG, et al. Circulation and distribution of gold nanoparticles and induced alterations of tissue morphology at intravenous particle delivery. *J Biophotonics.* 2009 May; 2(5):292-302.

Thomas M, Klibanov AM. Conjugation to gold nanoparticles enhances polyethylenimine's transfer of plasmid DNA into mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Aug 5; 100(16):9138-43.

Tkachenko AG, Xie H, Coleman D, Glomm W, Ryan J, Anderson MF, et al. Multifunctional gold nanoparticle-peptide complexes for nuclear targeting. *J Am Chem Soc.* 2003 Apr 23; 125(16):4700-1.

Tkachenko AG, Xie H, Liu Y, Coleman D, Ryan J, Glomm WR, et al. Cellular trajectories of peptide-modified gold particle complexes: comparison of nuclear localization signals and peptide transduction domains. *Bioconjug Chem.* 2004 May-Jun; 15(3):482-90.

Tsoli M, Kuhn H, Brandau W, Esche H, Schmid G. Cellular uptake and toxicity of Au55 clusters. *Small.* 2005 Aug; 1(8-9):841-4.

Tsujimoto Y, Shimizu S. Another way to die: autophagic programmed cell death. *Cell Death Differ.* 2005 Nov; 12 Suppl 2:1528-34.

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

Turner M, Golovko VB, Vaughan OP, Abdulkin P, Berenguer-Murcia A, Tikhov MS, et al. Selective oxidation with dioxygen by gold nanoparticle catalysts derived from 55-atom clusters. *Nature*. 2008 Aug 21; 454(7207):981-3.

Unfried K, Albrecht C, Klotz LO, Von Mikecz A, Grether-Beck S, Schins RPF. Cellular responses to nanoparticles: target structures and mechanisms. *Nanotoxicology*. 2007; 1:52–71.

Vandeputte C, Guizon I, Genestie-Denis I, Vannier B, Lorenzon G. A microtiter plate assay for total glutathione and glutathione disulfide contents in cultured/isolated cells: performance study of a new miniaturized protocol. *Cell Biol Toxicol*. 1994 Dec;10(5-6):415-21.

Verma A and Stellaci F. Effect of Surface Properties on Nanoparticle-Cell Interactions. *Small*. 6; (1), 12-21.

Verma A, Simard JM, Worrall JW, Rotello VM. Tunable reactivation of nanoparticle-inhibited beta-galactosidase by glutathione at intracellular concentrations. *J Am Chem Soc*. 2004 Nov 3; 126(43):13987-91.

Verma A, Uzun O, Hu Y, Han HS, Watson N, et al. Surface-structure-regulated cell-membrane penetration by monolayer-protected nanoparticles. *Nat Mater*. 2008 Jul; 7(7):588-95.

Villiers CL, Freitas H, Couderc R, Villiers M-B, Marche PN. Analysis of the toxicity of gold nano particles on the immune system: effect on dendritic cell functions. *J Nanoparticle Res*. 2009; 12(1):55-60.

Warheit DB, Sayes CM, Reed KL, Swain KA. Health effects related to nanoparticle exposures: environmental, health and safety considerations for assessing hazards and risks. *Pharmacol Ther*. 2008 Oct; 120(1):35-42.

Warheit DB. How meaningful are the results of nanotoxicity studies in the absence of adequate material characterization? *Toxicol Sci*. 2008 Feb;101(2):183-5.

Worle-Knirsch JM, Pulskamp K, and Krug HF. Oops they did it again! Carbon nanotubes hoax scientists in viability assays. *Nano Lett.* 2006 Jun;6(6):1261-8.

Xia T, Kovochich M, Brant J, Hotze M, Sempf J, Oberley T, et al. Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm. *Nano Lett.* 2006 Aug; 6(8):1794-807.

Yen HJ, Hsu SH, Tsai CL. Cytotoxicity and immunological response of gold and silver nanoparticles of different sizes. *Small.* 2009 Jul; 5(13):1553-61.

Zhang Y, Zhou J, Cao X, Zhang Q, Lim CU, Ullrich RL, Bailey SM, Liber HL, *Cancer Lett.* 2007, 250, 63.

Zharov VP, Mercer KE, Galitovskaya EN, Smeltzer MS. Photothermal nanotherapeutics and nanodiagnostics for selective killing of bacteria targeted with gold nanoparticles. *Biophys J.* 2006 Jan 15; 90(2):619-27.