

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – UNASAU
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – PPGCS
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

JONATHANN CORRÊA POSSATO

**EFEITOS DO TRATAMENTO CRÔNICO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO
NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA E NOS PARÂMETROS DE ESTRESSE
OXIDATIVO EM CAMUNDONGOS mdx.**

CRICIÚMA, FEVEREIRO DE 2017.

JONATHANN CORRÊA POSSATO

**EFEITOS DO TRATAMENTO CRÔNICO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO
NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA E NOS PARÂMETROS DE ESTRESSE
OXIDATIVO EM CAMUNDONGOS mdx.**

Dissertação de Mestrado ou Tese de
Doutorado apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências da Saúde da
Universidade do Extremo Sul Catarinense
para obtenção do título de (Mestre ou
Doutor) em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Cesar Lock
Silveira

Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Andrez
Machado de Ávila

CRICIÚMA, FEVEREIRO DE 2017.



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão.
Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de 03.06.2005

ATA DE MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – Nº 271

Com início às 14h00 (quatorze horas) do dia quinze do mês de fevereiro de 2017 (dois mil e dezessete), realizou-se, no Mini Auditório do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), o seminário formal de apresentação dos resultados da dissertação de Mestrado de **Jonathann Corrêa Possato**, sob a orientação do Prof. Dr. Paulo César Lock Silveira, intitulada **"EFEITOS DO TRATAMENTO CRÔNICO COM NANOPARTÍCULAS DE OURO NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA E NOS PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM CAMUNDONGOS MDX"**. A dissertação foi examinada por uma banca examinadora constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. Eduardo Pacheco Rico (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovado; Prof. Dr. Ricardo Aurino de Pinho (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovado e Prof.ª Dra. Clarissa Martinelli Comin (Universidade do Sul de Santa Catarina - UNISUL) – Conceito final: Aprovado. Com o resultado final: **APROVADO**, o aluno finalizou seus estudos em nível de Mestrado, fazendo jus ao grau de MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE. Os trabalhos foram concluídos às 15h00 (quinze horas), dos quais eu, Diana Ghisi Daniel, Secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, lavrei a presente ata, que assino juntamente com a Prof.ª Dra. Josiane Budni Coordenadora Adjunta do Programa. Criciúma, 15 (quinze) de fevereiro de 2017 (dois mil e dezessete).


Prof.ª Dra. Josiane Budni
Coordenadora Adjunta do PPGCS


Diana Ghisi Daniel
Secretária

FOLHA INFORMATIVA

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

Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica do Exercício – LAFIBE e Laboratório de Biologia Molecular e Celular - LABIM do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde e Laboratório de Síntese de Complexos Multifuncionais – LASICOM do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC.

RESUMO

A distrofia muscular de Duchenne (DMD) é uma miopatia caracterizada pela degeneração muscular progressiva, hereditária e recessiva ligada ao cromossomo X, afetando mais o sexo masculino. Na DMD há uma deficiência da proteína distrofina, causada pela sua mutação do gene que a codifica, e ao passar do tempo aparecem sinais clínicos da doença como fraqueza muscular e cansaço ao realizar atividade física. O aumento da atividade física em pacientes com DMD leva a um estado oxidativo celular maior, sendo que alguns estudos já demonstram o processo de estresse oxidativo presente nesses pacientes. O aumento do quadro oxidativo altera sua homeostasia e modifica seu estado sinalizatório, como a alteração na via do NF- κ B. Atualmente, há vários trabalhos observando os efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes das nanopartículas de ouro (GNPs) em modelos de lesão inflamatória. Diante disso, o objetivo do trabalho foi avaliar os efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes da administração crônica de nanopartículas de ouro em camundongos mdx. Neste trabalho utilizamos 40 camundongos mdx de 2 meses de idade, sendo separados por grupos com "N" amostra de oito animais, sendo: Grupo Controle (GC): Sem modificação genética; Grupo mdx (mdx): Modificado sem tratamento; mdx + Nanopartículas de ouro (GNPs) (2,5mg/Kg); mdx + GNPs (7,0mg/Kg); mdx + GNPs (21mg/Kg). A administração de nanopartículas de ouro foi realizada por via subcutânea, com diâmetro médio de 20nm, em soluções com concentrações de 2,5mg/kg, 7,0mg/Kg e 21mg/Kg. O tratamento foi realizado por 30 dias com intervalo de 48 horas, totalizando 14 aplicações. Após 24 horas da última aplicação, os animais foram eutanasiados por decapitação e a região central do gastrocnêmio foi cirurgicamente removida, processada e armazenada em freezer -80°C para posteriores análises bioquímicas e histológicas. Observamos, como resultados do nosso estudo, que os ratos mdx demonstraram aumento nos parâmetros de estresse oxidativo e que quando utilizamos GNPs como tratamento o quadro é revertido, assim, dando suporte experimental para a hipótese de que as GNPs têm um potencial antioxidante, protegendo a célula quando ocorre desbalanço na produção de radicais livres. A administração de nanopartículas também obteve melhoras nos aspectos histológicos da doença Duchenne. Assim, permitem-nos concluir que a administração crônica de nanopartículas de ouro apresentou um efeito anti-inflamatório em gastrocnêmio de ratos mdx, diminuindo as alterações morfológicas induzidas pela resposta inflamatória e efeito antioxidante, revertendo o quadro de estresse oxidativo.

Palavras Chaves: Duchenne, estresse oxidativo, inflamação miopatia, nanopartículas.

ABSTRATC

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a myopathy characterized by progressive and hereditary recessive muscle degeneration related to the chromosome X, affecting the male sex almost exclusively. In DMD, there is a deficiency of the protein dystrophin which is caused by the mutation of its encoding gene, and the clinical signs of the disease, such as muscle weakness and fatigue when performing physical activity, use to appear over time. The increase of the physical activity in patients with DMD leads to a higher cellular oxidative status, and some studies already demonstrate the oxidative stress process in these patients. The increase of the oxidative status changes its homeostasis and modifies its signaling status, such as the alteration in the NF- κ B pathway. Currently, several studies have been carried out observing the anti-inflammatory and antioxidant effects of gold nanoparticles (GNPs) in inflammatory injury models. Thus, the aim of this study was to evaluate the anti-inflammatory and antioxidant effects of chronic administration of gold nanoparticles in mdx mice. In this work, we used 40 mice with 2 months of age that were separated into groups of "N" sample of eight animals, as follows: Control Group (CG): No genetic modification; mdx Group: Modified without treatment; mdx + Gold nanoparticles (GNPs) (2.5 mg / kg); mdx + GNPs (7.0mg / kg); mdx + GNPs (21mg / kg). The administration of gold nanoparticles was performed subcutaneously, with average diameter

of 20 nm, in solutions with concentrations of 2.5mg / kg, 7.0mg / kg and 21mg / kg. The treatment was performed for 30 days with a 48-hour interval totaling 14 applications. 24 hours after the last application the animals were euthanized by decapitation and the central region of the gastrocnemius was surgically removed, processed and stored in a freezer at -80 ° C for further biochemical and histological analyzes. In the results of our study, we observed that mdx mice presented an increase in oxidative stress parameters and that, when we used GNPs as a treatment, the situation was reversed, thus, providing experimental support for the hypothesis that the GNPs have an antioxidant potential, protecting the cell when an unbalance in the production of free radicals occurs. Nanoparticle administration also improved the histological aspects of Duchenne disease. This allows us to conclude that the chronic administration of gold nanoparticles has an anti-inflammatory effect in the gastrocnemius of mdx mice, by reducing the morphological changes induced by the inflammatory response and antioxidant effect, and reversing the oxidative stress.

Key Words: Duchenne, oxidative stress, inflammation myopathy, nanoparticles.

SUMÁRIO

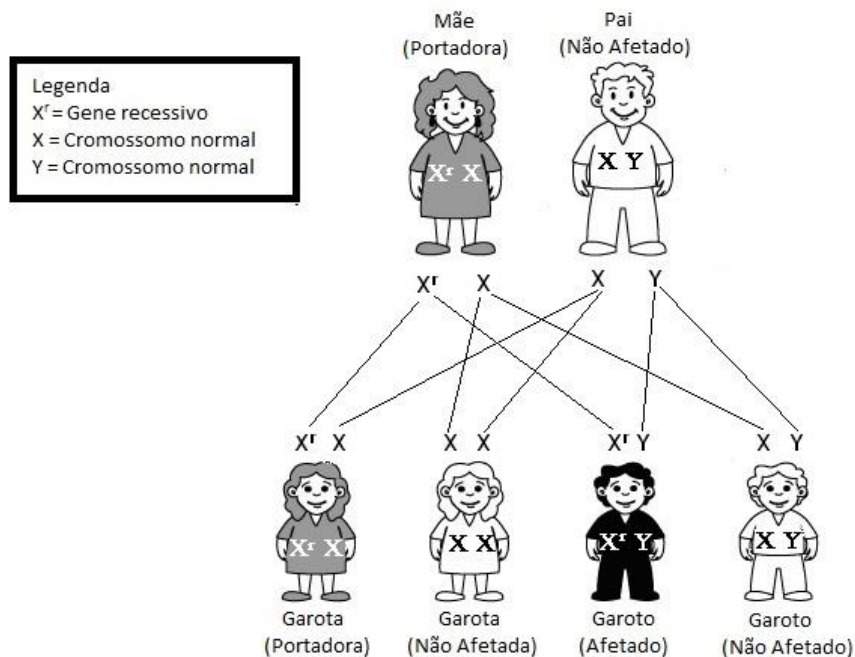
1 INTRODUÇÃO	8
1.1 DUCHENNE	8
1.2 INFLAMAÇÃO NA DOENÇA DUCHENNE.....	9
1.3 ESTRESSE OXIDATIVO NA DOENÇA DUCHENNE	12
1.4 NANOTECNOLOGIA E NANOPARTÍCULAS DE OURO.....	14
2 OBJETIVOS	17
2.1 OBJETIVO GERAL	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3 MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1 ASPECTOS ÉTICOS.....	18
3.2 GRUPOS.....	18
3.3 TRATAMENTO.....	19
3.4 TÉCNICAS LABORATORIAIS	19
3.4.1 Síntese e caracterização das nanopartículas de ouro.....	19
3.4.2 Determinação intracelular de ROS e óxido nítrico.....	21
3.4.3 Marcadores de danos oxidativos	22
3.4.4 Defesas antioxidantes	22
3.4.5 Conteúdos de Proteínas.....	23
3.4.6 Histologia.....	23
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	23
4 RESULTADOS	23
4.1 Histologia.....	23
4.2 Oxidantes	25
4.3 Dano oxidativo.....	27
4.3 Antioxidantes	29
5 DISCUSSÃO	31
6 CONCLUSÃO	368
REFERÊNCIAS	39

1 INTRODUÇÃO

1.1 DISTROFIA MUSCULAR DUCHENNE

A distrofia muscular de Duchenne (DMD) é uma miopatia caracterizada pela degeneração muscular progressiva, sendo que dentre as miopatias conhecidas DMD é a mais frequente, com incidência de 1 caso para 3500 nascidos vivos do sexo masculino. A DMD é uma doença genética recessiva ligada ao cromossomo X, assim, afetando mais o sexo masculino, já que a mulher ficaria com um alelo dominante, sendo assim heterozigótica para a doença e virando somente portadora (figura 1) (SUSSMAN, 2002; MANZUR et al., 2008).

Figura 1 - Ilustração do padrão de herança da DMD. Indivíduo afetado por herdar o cromossomo X alterado (recessivo) da sua mãe que não apresenta doença por ter um cromossomo X normal (dominante).



Fonte: Adaptada de www.mda.org.au.

Na DMD ocorre uma deficiência da proteína distrofina causada pela mutação do gene que a codifica, apresentando assim menos de 3% em comparação a um indivíduo normal e/ou sem a doença (ANDERSON, 1992). O déficit dessa proteína é um dos fatores que causam lesões das membranas de fibras musculares, permitindo maior concentração de cálcio intracelular, ativando proteases intracelulares, sendo causa de morte das células musculares juntamente com inflamação, proliferação de tecido conjuntivo e infiltração adiposa (EVANS, 2008).

Os sintomas clínicos da DMD estão presentes desde o nascimento, mas se tornam evidentes com o passar do tempo, destacando entre os 3 e 5 anos de idade.

A característica clínica principal é a perda de força muscular, sendo mais acentuada em músculos proximais e músculos flexores do pescoço. Ao passar do tempo aparecem sinais de fraqueza muscular e cansaço ao realizar atividade física com tendência a progredir para o uso de cadeira de rodas (SUSSMAN, 2002; TYLER, 2003; MANZUR et al., 2008). Estudos sobre a distrofia muscular Duchenne postulam a hipótese do óxido nítrico sobre as fibras musculares. O óxido nítrico é produzido no músculo pelo óxido nítrico sintase que está normalmente ancorada na cadeia proteica da distrofina. Em pacientes sem o complexo proteico o óxido nítrico sintase fica livre no citosol e seu conteúdo é reduzido. Estudo já demonstra que óxido nítrico não é causador desta distrofia, mas pode contribuir para desregulação celular e inflamação muscular na doença (DECONINCK; DAN, 2007).

Alguns autores discutem a hipótese mecânica da DMD que está relacionada à fragilidade das fibras musculares em pacientes com distrofia. Nessa doença a falta de distrofina e outros complexos de proteínas associados que suportam a ideia de que sua ausência poderia comprometer a integridade da membrana muscular das fibras, bem como a capacidade de manter a contração excêntrica (DECONINCK; DAN, 2007). O aumento da atividade física eleva o estado oxidativo celular, sendo que alguns estudos já demonstram o processo de estresse oxidativo celular presente em pacientes com DMD, em biopsia muscular (MECHLER et al, 1984). A Alta taxa de espécies reativas de oxigênio em células deficientes de distrofina altera o estado de homeostasia celular e modifica seu estado sinalizatório como exemplo, a alteração na via do fator nuclear kappa B (NF- κ B) está ligada à via inflamatória celular e sobrevivência celular (EVANS, 2009).

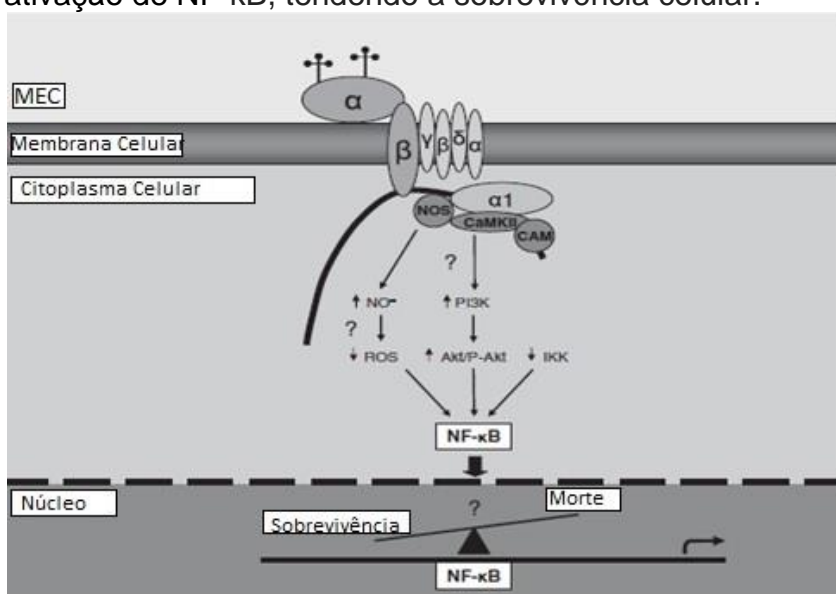
1.2 INFLAMAÇÃO NA DOENÇA DUCHENNE

Uma das características da DMD é a presença de inflamação crônica que ocorre nas células musculares em pacientes que tenham a doença genética ou em camundongos modificados. Nessa doença, ocorre o aumento de citocinas pró-inflamatórias no músculo como interleucina 6, fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucina 1beta (TIDBALL, 2005). O processo inflamatório também recruta muitos leucócitos, sendo muito proeminente linfócitos e macrófagos em tecido muscular de

pacientes DMD ou em camundongos mdx. Ainda que a célula não tenha a cadeia proteica primária (Distrofina) e continue com a doença, o processo inflamatório dificulta o processo de regeneração e reparo tecidual, processo que iria ocorrer se essa inflamação fosse reduzida (HODGETTS, GROUND 2004; TIDBALL, 2005).

No trabalho de Evans et al (2009), os autores discutem que a resposta inflamatória na presença da cadeia de distrofina (figura 2), encontra-se reduzida, levando a sobrevivência celular. Os níveis de cálcio intracelular são menores quando se tem a cadeia de distrofina e que o mesmo acaba sinalizando para a manutenção e hipertrofia muscular e dos avanços, nesse sentido o exato mecanismo ainda não está totalmente descrito.

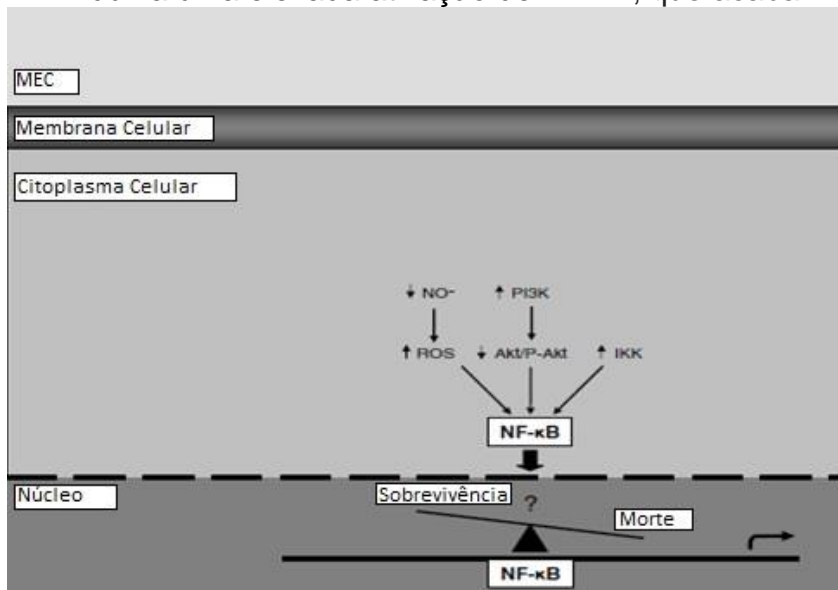
Figura 2 - Célula com cadeia primária distrofina. A sinalização nas fibras musculares saudáveis, a distrofina pode desempenhar um papel chave na regulação ou supressão da ativação de NF- κ B. No entanto, o mecanismo para como isso acontece não foi definido. Postula-se que, arranjo de reações bioquímicas celulares como a baixa produção de radicais livres e baixos níveis de IKK acarreta a uma leve ativação de NF- κ B, tendendo a sobrevivência celular.



Fonte: adaptada de EVANS, 2009 a.

Ainda sem muito esclarecimento a nível molecular, Evans et al (2009) demonstrou um aumento da via inflamatória quando a célula muscular apresenta falta da cadeia proteica distrofina, levando a um desbalanço e morte celular (figura 3). O mecanismo certo de como ocorre a ativação ainda não está bem descrito, mas o aumento de cálcio intracelular quando a célula tem deficiência de distrofina pode ser a chave para a indução da resposta inflamatória exacerbada, com consequente a morte celular (EVANS, 2009a).

Figura 3 - Célula sem cadeia proteica primária distrofina. Nas fibras musculares mdx, a perda da distrofina tem sido relatada como indutor para mudanças nas vias de sinalização que aumentam a ativação de NF- κ B. O aumento de radicais livres e de IKK induz a uma elevada ativação de NF- κ B, que acaba induzindo a morte celular.



Fonte: adaptada de EVANS, 2009a.

Estudo demonstra que o bloqueio da sinalização de NF- κ B é uma estratégia promissora para o tratamento da DMD, além da combinação de terapias com células-tronco e a inibição de NF- κ B, podendo ter um sinergismo a ser explorado (TANG, 2010). NF- κ B é um fator nuclear que é expresso em mamíferos e está intimamente ligado a transcrição de citocinas pró-inflamatórias. O fator é ativado por vários mecanismos incluindo lipopolissacarídeo (LPS), fator de necrose tumoral (TNF- α), Interleucina-1 β (IL-1 β) e IL 6 (KARIN, 2000).

O NF- κ B desempenha um papel essencial para promover a resposta inflamatória em células musculares com distrofia (MESSINA, 2006; LADNER, 2003). Níveis elevados de NF- κ B têm sido detectados em mais de um tipo de distrofia muscular, incluindo DMD (KUMAR, 2003). Kumar (2003) demonstrou que ativação crônica do NF- κ B, na DMD, atua no sistema imunológico, em células musculares danificadas, promove a inflamação e inibi a diferenciação miogênica em camundongos mdx.

Em um recente estudo sobre os mecanismos da doença em camundongos mdx foi sugerido que o NAD(P)H oxidase e o NF- κ B são importantes para a amplificação da deficiência de distrofina muscular. Contudo, mais alvos terapêuticos com ação antioxidantes estão sendo investigado a fim de diminuir o dano oxidativo dos pacientes com DMD (KIM et al, 2012).

Por exemplo, Terrill (2015) demonstrou que a deficiência de distrofina perturba o metabolismo da taurina no músculo e sugere que a sua suplementação poderia ser uma terapia em potencial para pacientes com DMD, porém mais estudos ainda são necessários. Outro possível alvo para ser utilizado em suplementação com ômega-3. Foi relatado, recentemente, que a suplementação com ômega-3 por um longo prazo em camundongos mdx, diminuiu os níveis de NF- κ B, TNF- α e aumentou MyoD, resultando em uma proteção para o músculo esquelético contra a necrose (APOLINARIO, 2015).

1.3 ESTRESSE OXIDATIVO NA DOENÇA DUCHENNE

A possibilidade que o estresse oxidativo contribua para a DMD foi proposta por Binder et al. (BINDER et al, 1965), que observou semelhanças da DMD com a deficiência de vitamina E, que aumenta os níveis de radicais livres e danos oxidativos. Mendell et al (1971) sugeriu que a lesão por isquemia e reperfusão do músculo produz lesões oxidativas que se assemelham aos achados encontrados em pacientes com DMD. No início, pesquisadores da área de biologia e da medicina não estudavam os mecanismos vinculados aos radicais livres, mas com o passar do tempo foi introduzido nessas áreas por profissionais da saúde interessados na oxidação celular (GARCIA, 1993). O radical livre é uma molécula química que possui um elétron desemparelhado na última camada, ou seja, tornando a mesma muito instável e muito reativa, com uma facilidade de se ligar a diversas moléculas celulares e derivados de cada uma delas (HALLIWELL; GUTTERIDE, 2007). Os radicais livres são formados por absorção de radiação, por reações químicas redox ou por processos de catálise enzimáticas (SLATER, 1984).

Em pacientes com DMD, a peroxidação lipídica, a oxidação de proteína e a oxidação de DNA estão aumentadas, os mesmos achados também foram vistos em modelo animal mdx. Em pacientes com DMD, o nível de carbonilação proteica em músculo quadríceps foi aumentado cerca de (211%) em relação ao grupo controle (HAYCOCK, 1996). Os radicais livres em excesso causam danos celulares, podendo ser na membrana pela lipoperoxidação levando a alterações em sua funcionalidade, danos em aminoácidos pela oxidação dos mesmos, mudando a função normal, ocorrendo desequilíbrio e morte celular (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; MATSUO; KANEKO, 2001).

Em linhagem de camundongos mdx foi observado que os produtos da lipoperoxidação lipídica são constantemente elevados em músculo esquelético quando comparados aos músculos esqueléticos de camundongos controle (sem mutação) (RAGUSA et al, 1997). Também foram encontrados valores elevados para NADH oxirredutase e citocromo C em quadríceps e gastrocnêmio comparados a ratos controle (HAUSER et al, 1995).

Em um estudo utilizando quelante de ferro, observou redução dos níveis de NF- κ B em diafragma de camundongos mdx. Os autores sugerem que a diminuição de espécies reativas por uso do quelante afetou a ativação da via inflamatória e que a formação de radicais livres influenciou no processo inflamatório na doença Duchenne (KUMAR, 2003; MORAES, 2015).

Os leucócitos constituem como principal fonte de radicais livres em resposta inflamatória, pois possui em sua membrana a enzima NADPH oxidase que gera o radical livre como proteção do corpo contra um agente agressor. Também temos a formação de ácido hipocloroso que é formado pela enzima mieloperoxidase, encontrada em neutrófilo e com ação bactericida (BULKLEY, 1993; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Outros radicais livres bastantes presentes são o peróxido de hidrogênio, o radical hidroxila (presença de ferro) e o óxido nítrico, todos estão ligados a condições inflamatórias (DAVIS, 2001; FRIDOVICH, 1998). A utilização de quelantes de ferro pode ser uma abordagem interessante para o tratamento de distrofinopatias (MORAES, 2015).

Um trabalho com biopsia de músculos de humanos demonstrou que em pacientes com DMD a peroxidação lipídica está muito mais elevada que em paciente saudáveis e/ou sem a doença Duchenne. No mesmo trabalho também foi visto que na atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) ocorreu um leve aumento da sua atividade em paciente DMD (MECHLER et al, 1984). O organismo Humano apresenta defesas antioxidantes que podem ser enzimáticas ou não enzimáticas, sendo as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathionaperoxidase (GPX) e glutathiona redutase (GR), com intuito de minimizar a agressão dos radicais livres no meio celular (BONNEFOY, 2002; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). A defesa não enzimática incluem as vitaminas, betacaroteno, glutathiona (GSH), entre outros (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

SPASSOV et al (2011) mostrou uma redução dos níveis do sistema glutathiona, sendo postulado que esta redução está associada a altos níveis de

radicais livres presentes na doença Duchenne. O excesso de espécies reativas de oxigênio e agressão celular ativa o sistema inflamatório, podendo levar a célula à morte (EVANS et al, 2009b).

De uma forma geral, a procura de novas terapias para tratamento da doença Duchenne já vem sendo estudada há algum tempo. Atualmente, a nanotecnologia aparece como uma promissora área que pode ser utilizada no tratamento de várias doenças, podendo destacar as nanopartículas de ouro (GNPs) para doenças inflamatórias (VICTOR, 2012).

1.4 NANOTECNOLOGIA E NANOPARTÍCULAS DE OURO

A nanotecnologia é uma área de pesquisa interdisciplinar, que engloba diversas áreas do conhecimento científico e em materiais, nanopartículas, nanotubos e nanofibrilas, que por sua vez são formados a partir de átomos ou moléculas (DURAN et al, 2006). Partículas em escala nanométrica apresentam uma grande área superficial, além de exibirem propriedades ópticas, magnéticas, mecânicas e/ou químicas que são diferentes das partículas macroscópicas (QUINA, 2004). A pesquisa com material nanométrico como a síntese e estabilização do mesmo pode antecipar a fabricação de estrutura da matéria em nível molecular e leva ao início de uma nova área de pesquisa, com novas propriedades físico-químicas, ação biológica diversificada e a introdução de uma tecnologia avançada em diversas áreas do conhecimento (DURAN et al, 2006).

Durante as últimas décadas, nanopartículas inorgânicas cujas estruturas exibem funcionalidade e propriedades biológicas devido ao seu tamanho, têm despertado muito interesse de diferentes grupos e áreas de pesquisa (BHATTACHARYA; MUKHERJEE, 2008). Dentre elas, destacam-se as nanopartículas de ouro, que recebem atenção especial devido às propriedades ópticas, eletrônicas, redox e catalítica (DANIEL; ASTRUC, 2004). As nanopartículas de ouro são ótimas para as pesquisas na área da saúde por serem biocompatíveis, de preparação simples e por possuírem tendência a fortes ligações com grupamentos tióis (HAINFELD et al, 2006; MUKHERJEE et al, 2005).

As nanopartículas de ouro podem modular o estado redox da célula, alterando o funcionamento normal e alterando vias de sinalização apoptótica de acordo com o tamanho da partícula a ser testada (GAO, 2011). Uma das principais

indicações clínicas dos compostos de ouro é para tratamento de doenças reumáticas (FELSON et al, 1990; SHAW, 1999).

A atividade antitumoral da cisplatina, descoberta em 1969, iniciou a investigação dessa atividade em outros metais, inclusive o ouro. Estimulando à blindagem de muitas fosfinas que contêm drogas à base de ouro, particularmente, o complexo bis(P₂)Au(I). Esse complexo mostrou propriedades antitumorais promissoras, porém exibiu toxicidade cardiovascular, o que impediu seu uso clínico (BERNERS-PRICE et al, 1987). As nanopartículas de ouro possuem uma atividade anti-inflamatória em modelo de lesão muscular por impacto. Os níveis de citocinas IL-1beta e TNF-alfa na região lesada tiveram uma diminuição quando tratados com GNP via fonoforese (VICTOR et al, 2012).

Estudos sugerem que as nanopartículas de ouro podem interagir com grupamentos orgânicos tióis presentes em proteínas, enzimas, entre outros componentes celulares. Essa ação de interação entre as nanopartículas e os grupamentos tióis, inativa a proteína e em bactérias, diminui a permeabilidade da membrana. Outro estudo mostrou a redução de TNF- α e do dano oxidativo no DNA em cérebro após a administração de nanopartículas de ouro, reduzindo as lesões cerebrais (SWAN, 1999; DANIEL; ASTRUC, 2004). Também foi visto que a forte ligação entre grupamento tiol e amino das biomoléculas com as nanopartículas de ouro apresentaram a capacidade de inibir a proliferação endotelial vascular (SONAVANE et al, 2008), e foi capaz de inibir de proliferação e migração celular endotelial, além da diminuição dos níveis de TNF- α (TSAI et al, 2007). Além disso, devido a sua boa distribuição, as nanopartículas de ouro tornaram-se também um excelente carreador de proteínas e biomoléculas, pois quanto mais distribuída, melhor a sua ação terapêutica (GHOSH et al, 2008).

A avaliação in vitro da penetração de nanopartículas de ouro na pele e no intestino de ratos mostrou que são excelentes carreadores tanto via transcutânea quanto via oral, e que quanto menor for a partícula mais permeável se torna (SONAVANE et al, 2008).

Um fato que deve ser levado em conta é o tamanho das nanopartículas. Nanopartículas de ouro de 8 nm são consideradas como altamente tóxicas já as de 37 nm foram consideradas como moderadamente tóxicas. Este fator é atribuído à diminuição das partículas que foi responsável pela depleção de glutathiona (GSH), levando a toxidade maior em células HL7702. A perda de GSH é associada a maior

produção de radicais livres, translocação de molécula pró-apoptótica, ativação de caspase 3, sendo a chave para o mecanismo de apoptose celular (GAO, 2011).

Estudos com o uso de nanopartículas de ouro em modelo de queimadura associadas à microcorrente demonstrou que o uso de nanopartículas de ouro aumentou a atividade da cadeia respiratória, diminuiu o dano celular e aumentou a atividade das enzimas antioxidantes (SILVEIRA et al, 2014).

A aplicação de gel de nanopartículas de ouro associado à diclofenaco de dieltilamonio também demonstrou efeito anti-inflamatório, sendo esse estudo em lesão do tendão, o uso de nanopartículas e diclofenaco demonstrou um sinergismo entre os mesmos e pela aplicação via iontoforese, ocorrendo diminuição dos níveis de interleucina 6 e TNF- α (DOHNERT et al, 2012).

As nanopartículas de ouro também foram usadas em modelo de uveíte em ratos, e os autores sugerem que nanopartículas de ouro têm ação anti-inflamatória e diminuem o dano celular por interferirem na via NF-kB (PEREIRA et al, 2012). QIN et al (2010) utilizou nanopartículas de ouro como biossensores, associando à nanopartículas pares de bases de DNA. Sendo assim, a dimerização dessas nanopartículas identificaria os pacientes com a mutação para doença Duchenne de maneira específica e sensível.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes da administração crônica de nanopartículas de ouro em camundongos mdx.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos regulatórios da administração de nanopartículas de ouro sobre a produção de oxidantes em músculo gastrocnêmio de camundongos.
- Avaliar os efeitos regulatórios da administração de nanopartículas de ouro sobre o sistema de defesa antioxidante em músculo gastrocnêmio de camundongos.
- Avaliar os efeitos regulatórios da administração de nanopartículas de ouro sobre danos oxidativos em músculo gastrocnêmio de camundongos.
- Avaliar os efeitos regulatórios da administração de nanopartículas de ouro sobre a resposta inflamatória através da análise histológica em músculo gastrocnêmio de camundongos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ASPECTOS ÉTICOS

O seguinte projeto foi executado dentro das normas éticas estabelecidas pelo COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal), experimentação animal. Este projeto foi aprovado sob o número 054/2015-2, pelo o Comitê de Ética em Pesquisa, para o Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC). O início dos procedimentos experimentais, o qual envolvam animais, só foi realizado após a aprovação do comitê de ética institucional e que possam prever relevância científica e social. No final dos experimentos, os animais foram eutanasiados por decapitação seguindo obediência aos protocolos éticos e científicos. Os animais modificados geneticamente foram gentilmente cedidos pelo Laboratório de Neurociência Experimental da Universidade do Sul de Santa Catarina, pela coordenadora do laboratório, Dra. Clarissa Comin.

3.2 GRUPOS

Para o seguinte projeto foram utilizados 40 camundongos mdx (2 meses pesando entre 25g - 30g). Cada grupo teve um "n" amostral de oito animais necessários para a realização das análises histológicas e bioquímicas. Os animais foram agrupados em gaiolas específicas, temperatura ambiente controlada entre $20 \pm 22^{\circ}\text{C}$, ciclo claro-escuro 12/12h e com livre acesso, alimentados com dieta padrão para roedores e água ad libitum.

Os animais foram distribuídos, randomicamente, em 4 grupos experimentais (n: 8):

- I. Grupo Controle (GC): Sem modificação genética;
- II. Grupo mdx (mdx): Modificado sem tratamento;
- III. mdx + Nanopartículas de ouro (GNPs) (2,5mg/Kg)
- IV. mdx + GNPs (7,0mg/Kg)
- V. mdx + GNPs (21mg/Kg)

3.3 TRATAMENTO

A administração de nanopartículas de ouro foi realizada por via subcutânea, com diâmetro médio de 20nm, em soluções com concentrações de 2,5mg/kg, 7,0mg/Kg e 21mg/Kg. O tratamento foi realizado por 30 dias com intervalo de 48 horas totalizando 14 aplicações.

	Dom	Seg	Ter	Qua	Qui	Sex	Sab
1ª Semana		X		X		X	
2ª Semana	X		X		X		X
3ª Semana		X		X		X	
4ª Semana	X		X		X		X

Tabela 1. Dias de tratamento.

Após 24 horas da última aplicação os animais foram eutanasiados por decapitação e a região central do gastrocnêmio foi cirurgicamente removida, processada e armazenada em freezer -80°C para posteriores análises bioquímicas.

3.4 TÉCNICAS LABORATORIAIS

3.4.1 Síntese e caracterização das nanopartículas de ouro (GNPs)

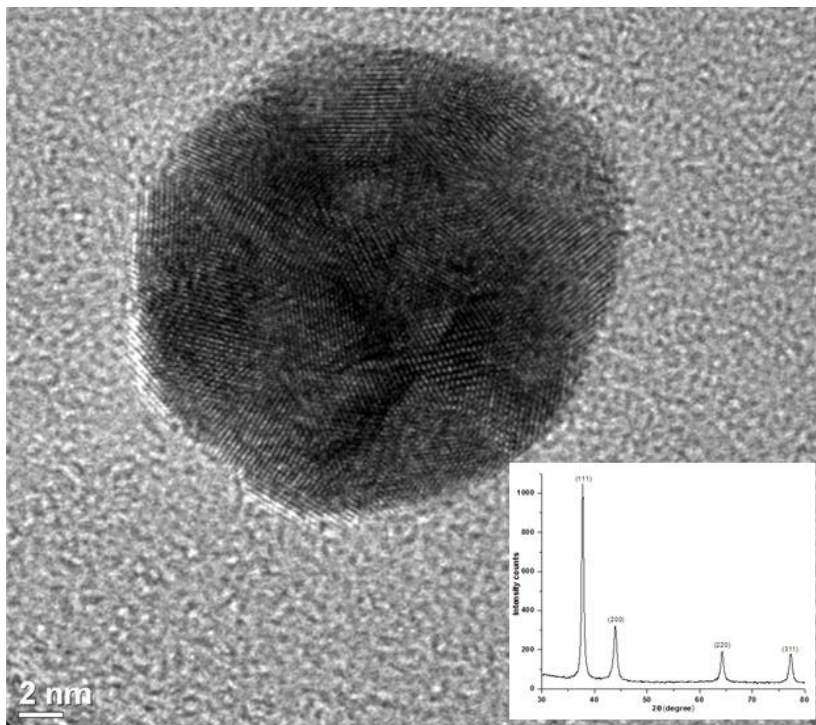
GNPs com tamanhos médios de 20 nm foram sintetizadas, como descrito por Turkevich e cols (1951), com pequenas modificações a partir de redução química do precursor metálico ácido tetracloroáurico (HAuCl_4) (Sigma-Aldrich, MO, EUA), e com o agente redutor e estabilizante citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Nuclear, SP, Brasil). O controle dimensional das nanopartículas foi efetuado variando-se a concentração do agente redutor. Inicialmente, 100 mL de 0,50 mM de ácido tetracloroáurico foram transferidos para um balão de fundo redondo, a solução foi aquecida até 90 °C e sob agitação a 700 rpm. Solução de citrato de sódio, previamente preparada, foi então adicionada e o sistema foi mantido à temperatura descrita, agitando a 110 G durante 20 minutos. A solução adquire a coloração correspondente ao tamanho esperado de GNPs. O pH foi ajustado a pH fisiológico com solução tampão e, posteriormente, centrifugada (13.000 rpm por 15 min), lavada duas vezes com água ultrapura e, finalmente, disperso em solução salina onde a concentração da solução também foi ajustada.

Após a síntese, as soluções de GNPs foram caracterizadas empregando-se a técnica de espectroscopia de ultravioleta-visível (UV-Vis), via monitoramento da banda de superfície de plasmon ressonante (SPR), usando um espectrofotômetro modelo UV-1800; difração de raios-x, utilizando um equipamento modelo XDR – 6000 (Shimadzu). Para a espectrometria de UV-visível, a medição da banda de SRP foi realizada a temperatura ambiente num espectrofotômetro utilizando uma cubeta de quartzo com 1 cm de caminho ótico. O espectro eletrônico da solução foi monitorado diariamente ao longo de uma semana, no intuito de revelar qualquer alteração do comprimento de onda na máxima absorção, obtendo-se valor de 532 nm para GNPs de 20 nm.

Para medidas de difratometria de raios-x (DRX), uma alíquota de 9 mL de solução de GNPs foi centrifugada a 10.000 rotações por minuto por 10 minutos. O sobrenadante foi removido e o material sedimentado transferido para uma porta amostra e seco em estufa. O material foi caracterizado com os seguintes parâmetros: Comprimento de onda da radiação do tubo de cobre: 1.54056, voltagem de 30 kV, corrente 30 mA, velocidade de varredura: 2°/min, ao passo de 0.02°, entre 20-80 (BALASUBRAMANIAN et al, 2010). O diâmetro médio das GNPS foi calculado usando a equação de Scherrer $2\theta = 38^\circ$ (Yan e cols, 2005). Onde, D é Diâmetro médio, K = 0,94, uma constante característica das partículas esféricas, λ é comprimento onda (raios-x usado): 1,54056, β : Largura da banda a meia altura (total na metade máxima do pico em radianos) e θ : ângulo de Bragg (do pico de 100% de intensidade) (BALASUBRAMANIAN ET AL, 2010).

A concentração de ouro foi mensurada por espectrofotometria de absorção atômica (Var Ian mo Del AA 240Z; Var Ian Medical Systems, Inc., Pelo Alto, CA, USA), obtendo concentração de 30 mg/L. A temperatura foi mantida a 25 °C. A concentração de ouro nas soluções de GNPS foi determinada por espectrometria de absorção atômica (EAA), utilizando um espectrofotômetro modelo AA240 FS-Fast Sequential Atomic Absorption Spectrometer marca Varian.

Figura 4 – Micrografia da imagem das nanopartículas de ouro (20nm) obtidas por microscopia de transmissão eletrônica (300kV). A inserção corresponde ao espectro de difração de raios-X.



3.4.2 Determinação intracelular de ERO e óxido nítrico

Ânion Superóxido: A produção de superóxido foi determinada pela oxidação da adrenalina em tampão contendo partículas sub-mitocondriais, succinato (inibidor da cadeia de transferência de elétrons) e catalase. Um controle negativo foi determinado com a presença da SOD (Poderoso e cols, 1996).

Diclorofluoresceína (DCFH): A produção de hidroperóxidos foi determinada pela formação intracelular de DCFH a partir da oxidação do diacetato de 2', 7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA) por ERO de acordo com o método descrito por Dong (2010), com algumas modificações.

Indicador da Formação de Óxido Nítrico (ON): A produção de ON foi avaliada, espectrofotometricamente, através do metabólito estável nitrito. Para mensurar o conteúdo de nitrito, as amostras foram incubadas com reagente Griess (1 % sulfanilamida e 0,1 % de N-1 (naphthyl) ethylenodiamina) em temperatura ambiente por 10 minutos e a absorbância foi medida a 540 nm. O conteúdo de nitritos foi

calculado com base numa curva padrão de 0 a 100 nM realizado com o metabólito nitrito de sódio (NaNO_2). Os resultados foram calculados em $\mu\text{mol Nitrito/mg}$ proteína (Chaea e cols, 2004).

3.4.3 Marcadores de danos oxidativos

Conteúdo de Proteínas Oxidadas: Foi determinado a partir do conteúdo total de tióis na presença de DTNB e lido, espectrofotometricamente, a 412nm (Aksenov e Markesbery, 2001).

Carbonilação de Proteínas: A oxidação de proteínas foi determinada mediante a quantificação de proteínas carboniladas através da reação de grupos carbonilas com a dinitrofenilhidrazina. Essa reação gera a formação de hidrazonas correspondentes. O conteúdo de carbonilas foi determinado, espectrofotometricamente, a 370nm como previamente descrito por Levine e colaboradores (1990). Os resultados foram calculados como nmol/mg de proteína, empregando o coeficiente de extinção molar de dinitrofenilhidrazonas de 22.000 $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Formação de malondialdeído: Com índice de peroxidação de lipídeos foi verificado a formação de malondialdeído (MDA) e mensurado por Cromatografia Líquida de alta performance (Proeminence Shimadzu) em uma coluna Ascentis® C18 (250 x 2.1 mm, 5 μm , Supelco Sigma-Aldrich), segundo Grotto e cols (2007).

3.4.4 Defesas antioxidantes

Superóxido Dismutase (SOD): Foi medida pela inibição da oxidação da adrenalina adaptado de Bannister; Calabrese (1987). As amostras do gastrocnêmio foram homogeneizadas em tampão de glicina. Os volumes de 5, 10 e 15 μL foram retirados da mesma, da qual 5 mL de catalase (0,0024 mg/mL de água destilada), tampão de glicina 175-185 mL (0,75 g em 200 ml de água destilada a 32°C, pH 10,2), 5 μL adrenalina (60 mM em água destilada + 15 mL/mL de HCl fumegante) foram adicionados. As leituras foram realizadas por 180s em intervalos de 10s e medido em leitor de ELISA a 480nm. Os valores foram expressos em unidade de SOD por miligrama de proteína (u/mg de proteína).

Atividade da Catalase (CAT): A atividade da CAT foi determinada pela taxa de decaimento do peróxido de hidrogênio lido em espectrofotômetro a 240 nm, segundo Aebi (1984).

3.4.5 Conteúdos de Proteínas

O teor de proteína a partir de tecido muscular homogeneizado foi determinado utilizando albumina de soro bovino como um padrão, de acordo com Lowry (1951). Reagente fosfomolibdico-fosfotúngstico (Folin fenol) é adicionado para ligar-se à proteína. O reagente foi lentamente reduzido passando de amarelo para azul. Absorbância foi lida a 750nm.

3.4.6 Histologia

Cortes transversais do músculo gastrocnêmio foram removidos e imersos em solução fixadora de paraformaldeído 10% (PFA) tamponado por 48 horas para posterior processamento histológico. O material foi incluído em parafina e cortado em micrótomo, obtendo-se cortes de 5 μ m de espessura. As lâminas foram coradas com hematoxilina & eosina para posterior aquisição das imagens e análise histológica da histoarquitetura muscular. O grau de degeneração muscular foi avaliado através da quantificação da porcentagem de núcleos centralizados em relação ao número total de fibras musculares (50 fibras por lâmina histológica) em área teste de morfometria. O diâmetro da área da fibra foi quantificado utilizando o software imageJ. Todos os dados foram tratados com teste estatístico ANOVA com *post-test* de Newman Keuls e os valores considerados, estatisticamente, diferentes com $p \leq 0.05$ (STEWART et al, 2016).

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos em média e erro padrão médio e analisados, estatisticamente, pela análise de variância (ANOVA) *one-way*, seguido pelo teste Newman-Keuls. O nível de significância estabelecido para o teste estatístico é de $P < 0,05$. Para tratamento estatístico do projeto de dissertação foi utilizado software graphpad 5.0.

4 RESULTADOS

4.1 Histologia

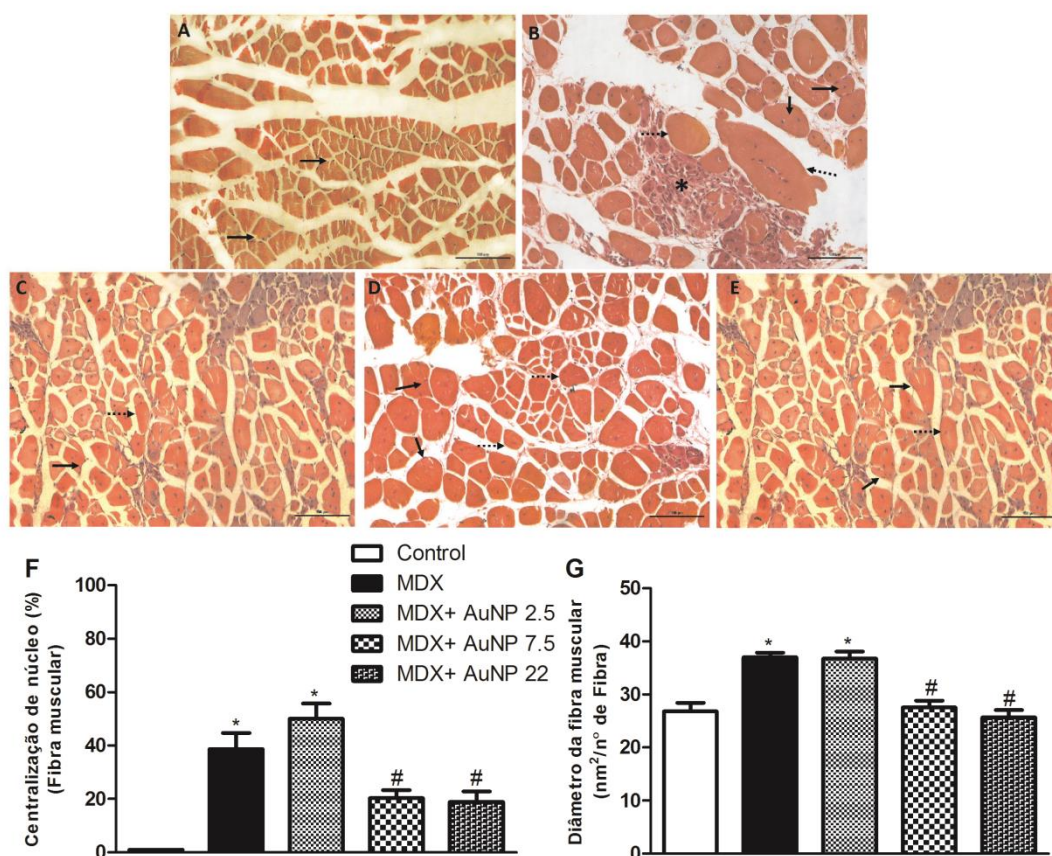
Imagens representativas de cortes histológicos em plano transversal do músculo gastrocnêmio de animais controle mdx e animais mdx tratados com nanopartículas de ouro (i.p), corados com coloração de (H&E). Na fig. 5 A, o grupo

dos animais controle apresentou morfologia das fibras musculares de aspecto normal com núcleo periférico (seta contínua). Na imagem do grupo dos animais mdx, fig. 5 B, foi possível observar fibras musculares com núcleos centralizados (seta contínua), compatível com miopatias. A fibra muscular apresentou aumento da área da fibra compatível com hiperplasia muscular (seta pontilhada), e a área do entorno das fibras musculares apresentou grande deposição de tecido conjuntivo sugerindo regiões de remodelamento (asterisco, *). Nas imagens 5 C, D e E, de animais mdx com administração de GNP nas doses de 2,5, 7,5 e 22,5 mg/kg, respectivamente, apresentaram melhora na morfologia muscular dos animais. Na figura 5 C, ainda foi possível encontrar muitas células com núcleo central (seta contínua), e fibras musculares com aumento de diâmetro da fibra (seta pontilhada). Nas figuras 5 D e E, o aspecto morfológico das fibras apresentava-se discretamente compatível com o grupo controle, com menor presença de núcleo centralizado (seta contínua), aparecimento de núcleos periféricos e diminuição da área da fibra (seta pontilhada).

Na fig. 5 F, o grupo mdx demonstrou um aumento significativo do número de núcleos centrais/número de fibra comparado ao grupo controle e uma diminuição significativa somente nos grupos tratados com 7,5 e 22,5 mg/kg de GNP. Na fig. 5 G, o grupo mdx demonstrou um aumento significativo do diâmetro da área da fibra comparado ao controle e uma diminuição significativa somente nos grupos tratados com 7,5 e 22,5 mg/kg de GNP.

Figura 5 (A-G): A administração de GNP nas doses de 7,5 e 22,5 mg/kg contribuiu para a melhora da integridade das fibras musculares de animais mdx. Cortes histológicos transversais do músculo quadríceps de animais GC e mdx tratados com diferentes concentrações de GNP foram corados com coloração de (H&E). As imagens representativas do músculo gastrocnêmio apresentaram na fig. 5 A, o grupo controle, na fig. 5 B, grupo mdx e os grupos mdx+ 2,5, 7,5 e 22,5 mg/kg de GNP nas

Fig. 5 C, D e E, respectivamente. Em todas as imagens histológicas, a seta contínua representa o núcleo da célula, a seta pontilhada, a área da fibra e o asterisco, o tecido conjuntivo. Os gráficos são representativos da quantificação morfométricas de núcleo centralizado e área da fibra muscular. A figura 5 F, demonstra a porcentagem de núcleo central/ por número de célula (50 fibras musculares/ campo). A figura 5 G, mostra a quantificação do diâmetro da fibra muscular por fibra muscular. Na figura 5 N=3/grupo, objetiva de 20x. n=3 para as imagens histológicas e n = 5 para as quantificações morfológicas. Dados foram tratados, estatisticamente, por análise de variância, one-way ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls e $p \leq 0.05$. (Imagens em objetiva de 20x).



Fonte: Autor.

4.2 Oxidantes

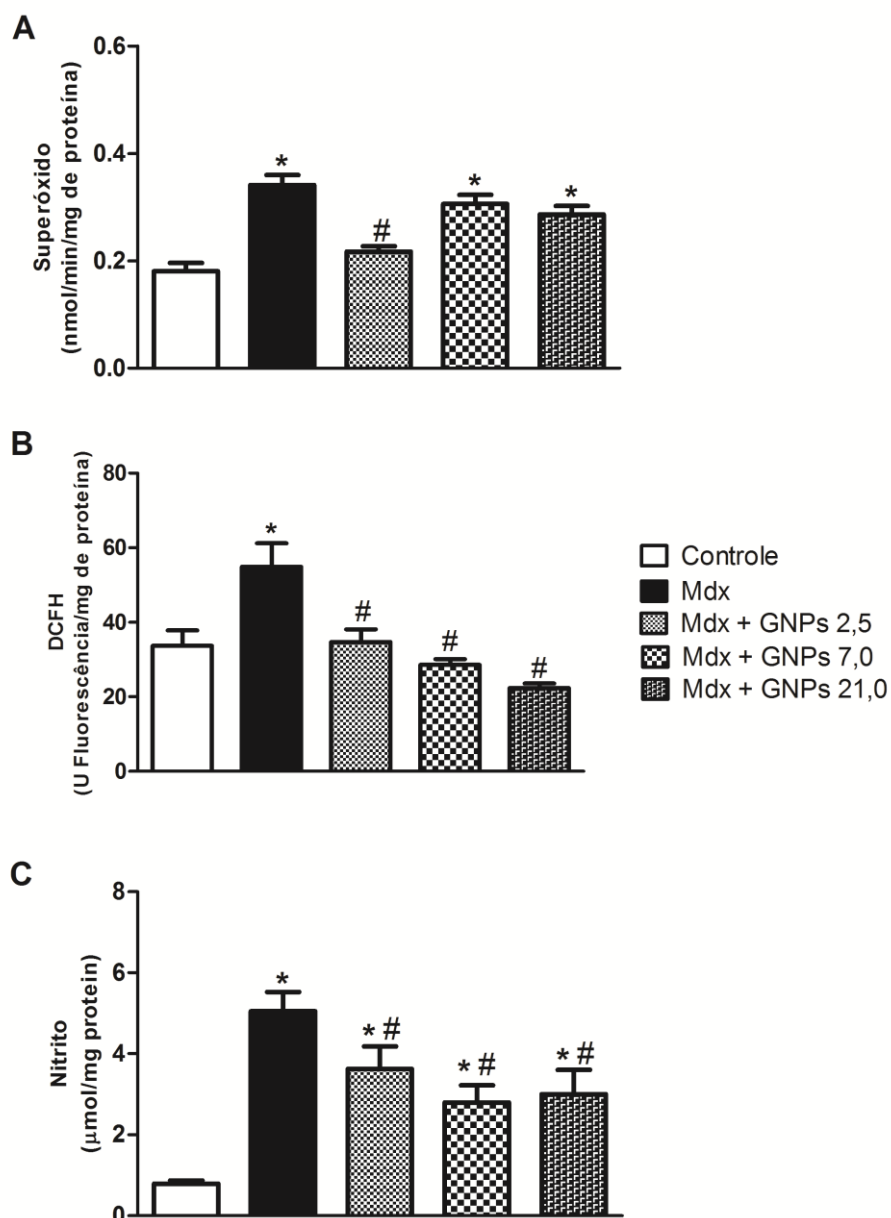
Quando analisamos os níveis de superóxido no músculo gastrocnêmio (Figura 6A), os grupos Mdx, Mdx + GNPs 7,0 e Mdx + GNPs 21,0 apresentaram um aumento significativo quando comparado ao grupo controle, onde temos camundongos controle. Entretanto apenas o grupo Mdx + GNPs 2,5 apresentou uma redução significativa dos níveis de superóxido comparado ao grupo mdx. Na figura

6B, observamos os níveis de DCFH, onde o grupo mdx apresentou um aumento significativo em relação ao grupo controle, entretanto todos os grupos tratados com GNPs demonstraram uma redução significativa em relação ao grupo mdx. Quando avaliamos os níveis de nitrito (Figura 6C), no músculo gastrocnêmio, observamos um aumento significativo em todos os grupos com ratos mdx em relação ao grupo controle, porém os grupos tratados com GNPs 2,5 mg/kg, 7,0 mg/kg e 21,0 mg/kg apresentaram uma redução significativa em relação ao grupo mdx.

Figura 6 – Efeitos da administração das GNPs sobre os níveis do sistema oxidante em camundongos mdx. (A) Níveis de superóxido; (B) níveis de DCFH e (C) conteúdo de nitrito. Os dados são apresentados em Média \pm EPM pela análise de variância (ANOVA) *one-way*, seguido pelo teste Newman-Keuls, sendo:

* Diferença estatística quando comparado com grupo controle ($p > 0,05$).

Diferença estatística quando comparado com grupo mdx ($p > 0,05$).



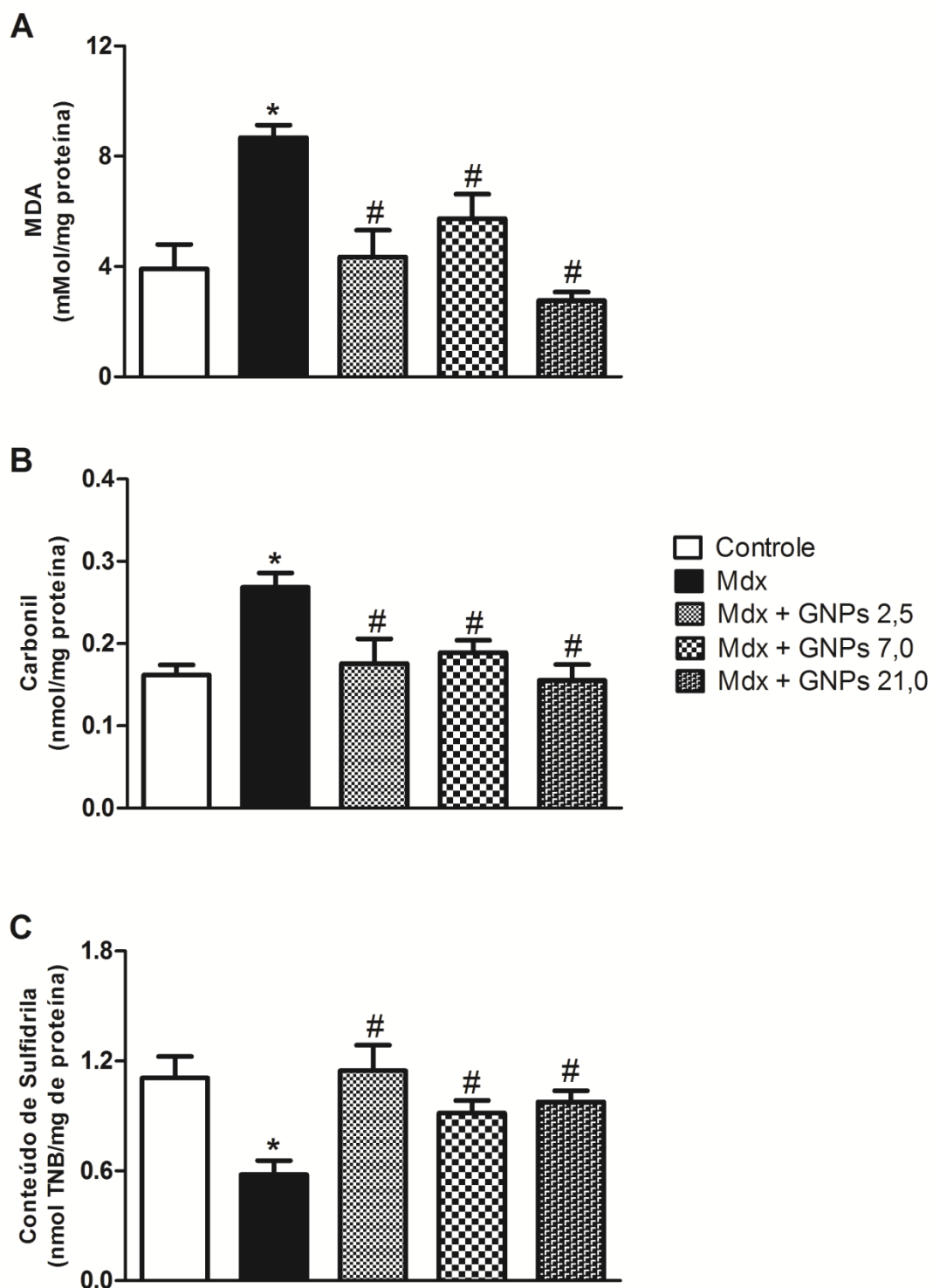
Fonte: Autor.

4.3 Danos oxidativos

Os danos oxidativos nas estruturas celulares causados por excesso de espécies reativas de oxigênio foram avaliados no músculo gastrocnêmio. Na figura 7^a, mensuramos por HPLC os níveis de malondialdeído (MDA) como índice de peroxidação lipídica. Podemos observar que o grupo Mdx apresentou um aumento significativo em relação ao grupo controle, e essa elevação foi revertida de forma significativa em todos os grupos tratados quando comparado ao grupo mdx, da mesma forma ocorreu nos níveis de carbonilação proteica (figura 7B). Além disso, determinamos o conteúdo de grupos sulfidril demonstrado na figura 7C, onde o

grupo mdx apresentou uma redução significativa em relação ao grupo controle, entretanto os grupos tratados com GNPs mostram um aumento significativo em relação ao grupo mdx.

Figura 7 – Efeitos da administração das GNPs sobre os níveis de dano oxidativo em camundongos mdx. (A) Níveis de MDA; (B) conteúdo de grupo carbonil e (C) conteúdo de sulfidrila. Os dados são apresentados em Média \pm EPM pela análise de variância (ANOVA) *one-way*, seguido pelo teste Newman-Keuls, sendo:
* Diferença estatística quando comparado com grupo controle ($p > 0,05$).
Diferença estatística quando comparado com grupo mdx ($p > 0,05$).



Fonte: Autor.

4.3 Antioxidantes

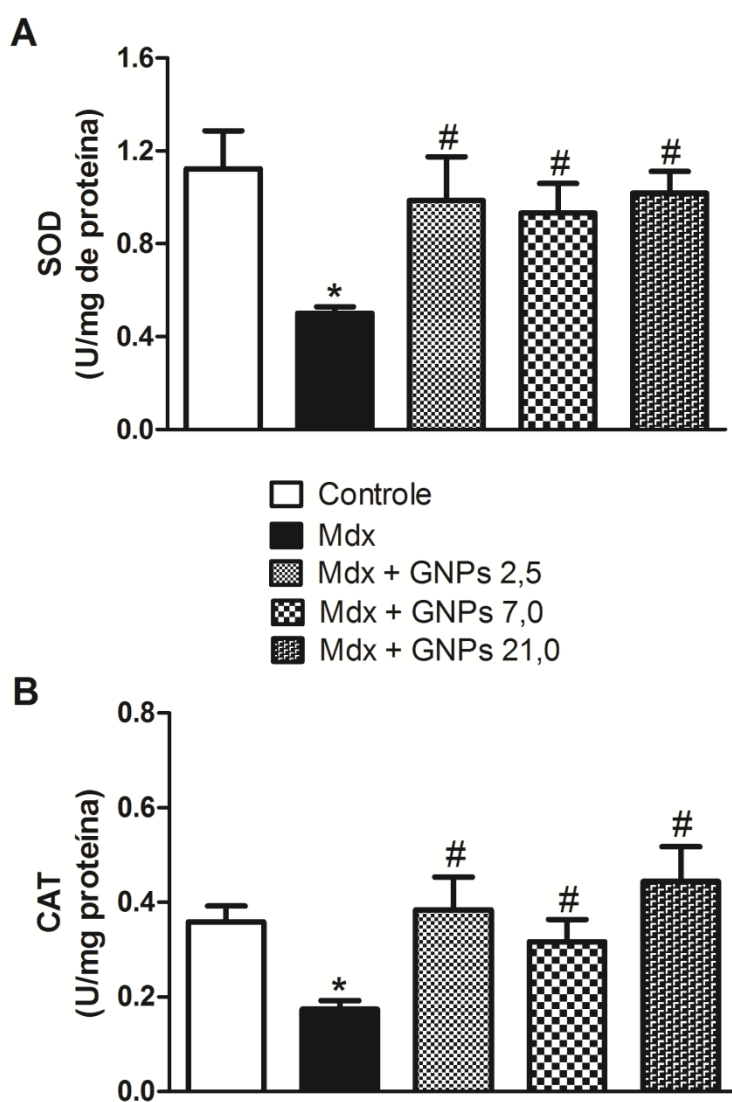
A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) foram mensurados como parâmetros do sistema antioxidante. Em relação à

atividade da SOD (Figura 8A), o grupo Mdx apresenta uma redução significativa em relação ao controle, no entanto os grupos tratados com GNPs revertem essa diminuição. Por último, analisamos a atividade da CAT (Figura 8B) e os resultados mostram as mesmas diferenças estatísticas encontradas na atividade da SOD.

Figura 8 – Efeitos da administração das GNPs sobre a atividade das enzimas antioxidantes em camundongos mdx. (A) Atividade da SOD e (B) atividade da CAT. Os dados são apresentados em Média \pm EPM pela análise de variância (ANOVA) *one-way*, seguido pelo teste Newman-Keuls, sendo:

* Diferença estatística quando comparado com grupo controle ($p > 0,05$).

Diferença estatística quando comparado com grupo mdx ($p > 0,05$).



Fonte: Autor.

5 DISCUSSÃO

Dentre as miopatias estudadas, a Duchenne e Becker, são as duas principais formas ligadas ao cromossomo X (BULFIELD et al, 1984). A distrofia muscular de Duchenne é hereditária e acomete células musculares por não ter o complexo proteico distrofina, deixando a célula com uma fragilidade maior que uma célula saudável. Muitos autores postulam vários mecanismos envolvidos na fisiopatologia da doença, dentre as principais está a fragilidade da membrana celular, resposta inflamatória com alta formação de espécies reativas de oxigênio (DECONINCK; DAN, 2007).

A análise histológica no músculo gastrocnêmio mostra uma centralização do núcleo no grupo mdx, e quando tratados com GNPs nas concentrações de 7 e 21 mg/Kg essa alteração é revertida, tornando-se similar ao grupo controle. A centralização do núcleo da célula muscular em camundongos mdx já foi demonstrada na literatura em muitos trabalhos (BULFIELD, 1984; CAMPBELL, 1995). Um estudo em diferentes tecidos musculares (masseter, temporal, soleo), demonstrou também um aumento da distribuição de núcleos centralizados em camundongos mdx quando comparado com grupo controle, chegando entorno de 75% núcleos centralizados (SPASSOV et al, 2010).

A integridade do músculo esquelético é crucial para sua atividade contrátil. Em virtude da sua forma fibrilar, a célula muscular é caracterizada por microfilamentos, multinucleada periféricamente com contração muscular voluntária. Características tais, como a centralização do núcleo da fibra muscular, pode comprometer a arquitetura intermiofibrilar. Esse tipo de anormalidade contribui para alterações na contração muscular e é muito encontrado inclusive em humanos, em quadro de miopatias (STEWART et al, 2016). Outro estudo demonstrou uma elevação na atividade da caspase-3 em camundongos mdx, sugerindo que a apoptose também poderia ser um dos mecanismos de morte celular (SAEMAN et al, 2016).

Ainda com relação à análise histológica pode se observar que houve um aumento dos diâmetros das fibras no grupo mdx, em relação ao grupo controle e que quando tratados com GNPs de 7 e 21 mg/Kg há redução desde diâmetro. Spassov et al (2010) demonstrou o mesmo padrão em tecido muscular de camundongos mdx, corroborando com nossos resultados. Essas alterações

histopatológicas encontradas confirmam que essa linhagem é um ótimo modelo de estudo para a distrofia muscular de Duchenne.

De acordo com Bulfield (1984), músculos de camundongos mdx apresentam necrose precoce, começando no dia 5, nos músculos da cabeça, tronco e cintura. Os processos necróticos e apoptóticos emergem nos membros a aproximadamente 3 semanas de idade. O processo de regeneração se inicia por volta da 6ª semana e percorrem até a 12ª semana (DANGAIN; VRBOVA, 1984). Em cerca de 90 dias, 90% das fibras esqueléticas de camundongos mdx apresentam núcleo centralizado, o qual indica o ciclo de degeneração celular (TORRES; DUCHEN, 1987). O processo inflamatório envolvido na regeneração e degeneração celular acaba alterando o sistema de sinalização e ocorrem migração e infiltração de células leucocitárias para o tecido muscular, podendo ser uma das causas de morte celular (PORTER et al, 2002).

Uchiyama et al (2014) demonstraram *in vivo*, a diminuição da adesão e migração de células leucocitárias após a indução da cascata inflamatória por LBT4 em células sanguíneas de ratos. Os autores postulam que as GNPs reduzem os níveis de quimiocinas e a ativação de NF- κ B. Além disso, nos últimos anos vários estudos já vêm mostrando uma diminuição na resposta inflamatória, utilizando a associação de GNPs com ultrassom terapêutico e microcorrentes em modelos de lesões tendinosas, musculares e epiteliais (melhora na morfologia tecidual e diminuição nos níveis de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β e IL-6). (DOHNERT et al, 2012; VICTOR et al, 2012; SILVEIRA et al, 2014 DOHNERT et al, 2015).

Além da resposta inflamatória muito elevada no músculo esquelético desses animais, muitos trabalhos também mostram uma elevada produção de ERO e ERN (RAGUSA, 1997; DISATNIK, 1998; TIDBALL; WEHLING-HENRICKS, 2007). Terril et al demonstrou que em cachorros com distrofia muscular ocorre uma elevada infiltração de macrófagos e neutrófilos nas células musculares (TERRILL, 2016). Em tecido esquelético os macrófagos têm função de limpeza celular, retirando o tecido necrótico, promovendo miogênese e envolvido na regeneração celular. Após a identificação da lesão, os macrófagos se acumulam no tecido para a limpeza e devido à ação do complexo NAD(P)H oxidase fagossomal, que utiliza oxigênio nas suas reações bioquímicas, o mesmo começa a produzir superóxido devido ao

suporte de oxigênio falho. (TIDBALL, 2005; BRUNELLI; ROVERE-QUERINI, 2008; GROUNDS, 2014).

Adicionalmente ao superóxido produzido pela resposta inflamatória, o óxido nítrico tem um papel importante na sinalização, já que sua produção está elevada em camundongos distróficos. O óxido nítrico é um radical formado pelo óxido nítrico sintase e está envolvido em processos fisiológicos e metabólicos (KAMINSKI, 2001; RANDO, 2001). Nas células temos vários subtipos de óxido nítrico sintase (eNOS, nNOS), sendo que nNOS fica ancorado, indiretamente, na cadeia proteica da distrofina. Nos casos de paciente com Duchenne, que não temos esta cadeia proteica, a nNOS transloca-se para citosol e fica ativa, assim produzindo altos níveis de óxido nítrico (WEHLING, 2001).

Nosso estudo demonstrou que em células musculares do gastrocnêmio de camundongos com distrofia muscular há um aumento dos níveis de ERO e ERN, em relação a camundongos saudáveis, corroborando com estudos prévios (DISATNIK, 1998; WEHLING-HENRICKS, 2007). Entretanto, quando tratamos com GNPs os grupos apresentam uma diminuição significativa desses níveis. Estudos anteriores já demonstraram uma redução dos níveis de superóxido, DCFH e nitrito em modelos animais de lesão muscular utilizando as GNPs como tratamento associada ou não a outras terapias. (DOHNERT et al, 2012; VICTOR et al, 2012; SILVEIRA et al, 2014; MARTÍN et al, 2014)

A redução de ON após a administração de GNPs já foi observada em outro estudo com cultura de macrófagos estimuladas com LPS. O estudo mostrou uma redução dos níveis de ON e iNOS, provavelmente pelas GNPs estarem regulando a transcrição dos níveis de iNOS (MA et al, 2010). Alguns trabalhos citam as GNPs como agente antioxidante, inibindo a cascata de formação das espécies reativas de oxigênio, e/ou melhorando o sistema de defesa antioxidante enzimático, mas o mecanismo exato ainda não está claro (BARATHMANIKANTH et al, 2010).

Recentemente, em um estudo com as GNPs foram avaliados os efeitos antioxidantes das mesmas e demonstraram que as GNPs se ligam diretamente ao radical livre, principalmente ao ânion superóxido, neutralizando-o, e que este efeito é dependente da dose, tamanho e da superfície da molécula (YAKIMOVICH et al, 2008; RAZZAQ et al, 2016). Corroborando com esse trabalho, Martin et al (2014) mostrou o mesmo efeito dose-dependente das GNPs como quelante de radicais livres. No trabalho de Yakimovich et al (2008) foi observado que o efeito antioxidante

máximo das nanopartículas ocorre no tamanho de 9 nm com concentração de 6%, e, além disso, os autores demonstraram que GNPs apresentam uma característica mimética a enzimas antioxidantes, interagindo diretamente com anion superóxido e radical hidroxila formando subprodutos menos reativos.

Terril (2016) observou que há uma elevação de dano proteico no músculo de cachorros distróficos via carbonilação proteica e diminuição do conteúdo de grupos tióis, demonstrando um alto grau de dano oxidativo. O teste de carbonilação proteica é usado como marcador irreversível de dano oxidativo proteico, sendo o mesmo encontrado em distúrbios inflamatórios. A oxidação de um determinado resíduo de aminoácido por um radical livre leva a formação de proteínas ou fragmentos peptídicos, contendo grupos carbonila altamente reativa (DALLE-DONNE, 2003; STADTMAN; LEVINE, 2003; HALLIWELL; WHITEMAN, 2004). O dano causado pelo excesso de radical livre afeta além de proteínas os lipídeos encontrados na membrana das células (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). A alta taxa de peroxidação lipídica já vem sendo demonstrada em estudos com camundongos e humanos com distrofia muscular (MECHLER et al, 1984; RAGUSA, 1997). Disatnik et al (1998) relatou altos níveis de MDA em sêro de camundongos mdx. O dano celular causado por radical livre também afeta os grupos tióis, sendo que a oxidação pode ser reversível ou irreversível, dependendo do nível de oxidação que ocorreu neste grupamento (WINTERBOURN, 2008; KLOMSIRI; et al, 2011).

Em nosso estudo demonstramos que ocorre uma elevação dos níveis de carbonilação proteica, níveis de MDA e diminuição de grupos tióis em camundongos com a distrofia (mdx), quando comparado com grupo controle. Estes resultados corroboram com os níveis de oxidantes observados neste trabalho, sendo que quanto maior os níveis de ERO e ERN, provavelmente, maiores serão os danos oxidativos celulares. Entretanto, nos grupos com tratamento com GNPs, observamos redução no dano oxidativo em todos os ensaios utilizados, quando comparamos com grupo mdx.

A diminuição dos danos pode estar associada à ação catalítica das GNPs sobre os radicais livres, ligando e neutralizando como citado anteriormente (DADUANG et al, 2015), e também como ação catalítica sobre NADH, aumentando o conteúdo de NAD via oxidação de NADH com o elétron sendo retirado pelas GNPs, assim, reduzindo a formação de radicais livres e aumentando a atividade da vitamina E em linhagem de hepatócitos (NIE et al, 2007).

Além do aumento nos níveis de ERO e ERN e, conseqüentemente, o aumento nos danos oxidativo, Disatnik et al (1998) demonstrou alteração no sistema antioxidante em camundongos mdx com 20 dias de vida, apresentando uma diminuição significativa na expressão de SOD e CAT. Nossos resultados demonstram também uma diminuição da atividade da SOD e CAT em camundongos mdx com 60 dias de idade. O desbalanço entre produção de radicais livres ou ROS e o sistema antioxidante é um fenômeno chamado de estresse oxidativo. As altas taxas de radicais livres levam aos danos celulares oxidativos, assim, ocorrendo lesões em proteínas, lipídeos e DNA, tornando a célula mais suscetível a danos na membrana externa, organelas e DNA, induzindo a inibição e/ou defeito de enzimas ou proteínas importantes ao funcionamento da célula (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

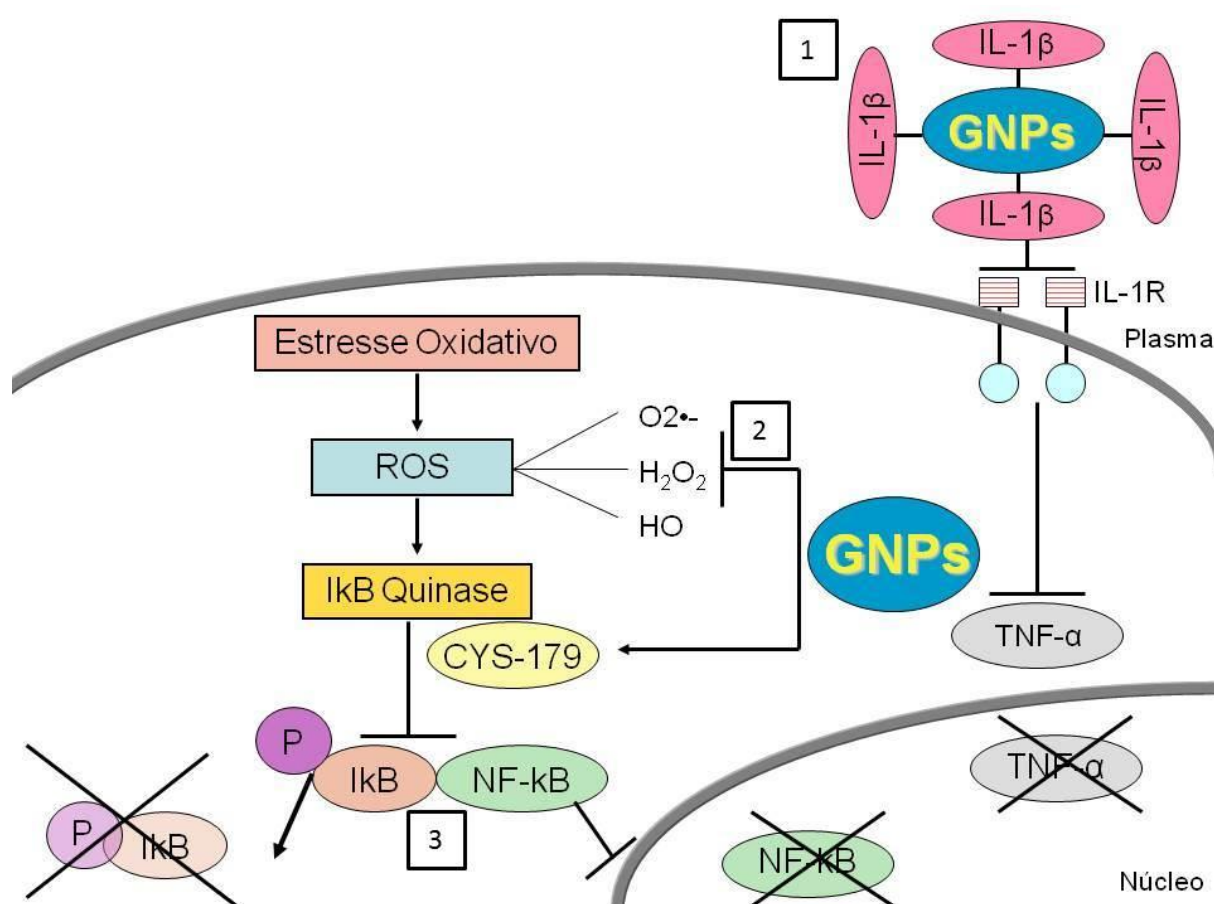
Ainda em nosso trabalho observamos o aumento da atividade das enzimas CAT e SOD quando tratados com GNPs em comparação com o grupo mdx em todas as concentrações. Martins et al (2010) demonstrou uma diminuição da expressão de CD68, sendo esta proteína ligada à membrana de macrófagos, e aumento da SOD1 em modelo de lesão epitelial, assim, demonstrando o possível efeito antioxidante e anti-inflamatório.

Em um estudo com modelo de dano cerebral, os autores demonstraram que as GNPs reduzem a translocação do citocromo c da mitocôndria para o citosol, assim, reduzindo a disfunção mitocondrial, formação de ERO e a sinalização apoptótica. Os autores também citam no trabalho, a importância de mais estudos sobre o real mecanismo de controle dos níveis de citocromo c causados por nanopartículas de ouro (PEDERSEN et al, 2009).

Lai et al (2015) demonstraram que nanopartículas de ouro aumentam níveis de NRF2, que induz a sinalização de genes antioxidantes, em um estudo com células endoteliais. Este aumento é causado por ação das nanopartículas de ouro que afeta as ligações tiois de keap1, assim, mudando sua conformação e liberando NRF2 para posterior transcrição de genes citoprotetores, desta forma, contribuindo com efeito antioxidante. Em adição, o efeito anti-inflamatório das GNPs pode estar auxiliando a redução de radicais livres, já que macrófagos e neutrófilos ativados produzem espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e ácido hipocloroso com a finalidade de degradação e limpeza celular (UCHIYAMA et al, 2014; CARNEIRO; BARBOSA, 2016).

Em outro estudo, Rocha (2016) ilustra, esquematicamente, os mecanismos de ação das nanopartículas de ouro sobre a via inflamatória e oxidativa propostos na literatura (figura 8), sendo: (1) a regulação negativa da citocina proinflamatória IL-1 β , não permitindo sua ligação a receptor específico; (2) inibição das espécies reativas de oxigênio e cascata do estresse oxidativo; (3) inibindo sinalização NF- κ B via bloqueio da fosforilação I κ B quinase com a não translocação de NF- κ B para núcleo.

Figura 8 - Ilustração sobre os possíveis mecanismos de ação das GNPs.



Fonte: Adaptado de Rocha, 2016.

Diante disso, nosso estudo observou que os ratos mdx demonstraram aumento nos parâmetros de estresse oxidativo, e que quando utilizamos GNPs como tratamento o quadro é revertido, assim, dando suporte experimental para a hipótese de que as GNPs têm um potencial antioxidante, protegendo a célula quando ocorre desbalanço na produção de radicais livres. Esse resultado corrobora com estudos anteriores já que demonstraram que as GNPs, possivelmente,

apresentam uma atividade antioxidante sem efeitos tóxicos em tamanho de 20 nm (DOHNERT et al, 2012; VICTOR et al, 2012; SILVEIRA et al, 2014; UCHIYAMA et al, 2014). Entretanto, mais estudos devem ser realizados para uma melhor compreensão do real mecanismo de ação das nanopartículas de ouro na distrofia muscular de Duchenne.

6 CONCLUSÃO

Os resultados encontrados na dissertação permitem concluir que a administração crônica de nanopartículas de ouro apresentou um efeito anti-inflamatório em gastrocnêmio de ratos mdx, diminuindo as alterações morfológicas induzidas pela resposta inflamatória da distrofia muscular de duchenne. Além disso, as GNPs também demonstraram um potencial antioxidante pela redução da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, diminuição do dano oxidativo e melhora na atividade antioxidante.

REFERÊNCIAS

- AEBI H. Catalase in vitro. *Meth Enzymol.* 105: 121-126. 1984.
- ANDERSON MS, KUNKEL LM. The molecular and biochemical basis of Duchenne Muscular Dystrophy. *Trends Biochem Sci.*17(8):289-92. 1992.
- APOLINÁRIO LM; et al. Long-Term Therapy With Omega-3 Ameliorates Myonecrosis and Benefits Skeletal Muscle Regeneration in Mdx Mice. *Anat Rec (Hoboken).* 298(9):1589-96. 2015.
- BALASUBRAMANIAN SK; et al. Characterization, purification, and stability of gold nanoparticles. *Biomaterials* 31, 9023-9030. 2010.
- BANNISTER JV, CALABRESE L. Assays for SOD. *Meth Biochem Anal.* 32: 279-312. 1987.
- BARATHMANIKANTH S; et al. Anti-oxidant effect of gold nanoparticles restrains hyperglycemic conditions in diabetic mice. *J. Nanobiotechnol.* 14:8–16. 2010.
- BERNERS-PRICE SJ, SADLER PJ. Interaction of the antitumor Au(I) complex [Au(Ph₂P (CH₂)₂PPh₂)₂]Cl with human blood plasma, red cells, and lipoproteins: ³¹P and ¹H NMR studies. *Journal of inorganic biochemistry.* 31: 267–281.1987.
- BHATTACHARYA R, MUKHERJEE P. Biological properties of "naked" metal nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews* 60: 1289–1306. 2008.
- BINDER HJ; et al. Tocopherol deficiency in man. *N Engl J Med.* 9;273(24):1289-97. 1965.
- BOVERIS, A. Biochemistry of free radicals: from electrons to tissue. *Medicina (b. Aires)*, 58:350-356. 1998
- BULFIELD G; et al. X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA.* 81:1189–1192. 1984

BULKLEY, GB. Free radicals and other reactive oxygen metabolites: clinical relevance and the therapeutic efficacy of antioxidant therapy. **Surgery**. 113:479-483. 1993.

BRUNELLI S, ROVERE-QUERINI P. The immune system and the repair of skeletal muscle. *Pharmacol Res*. 58(2):117-21. 2008.

.

CAMPBELL KP. Three muscular dystrophies: loss of cytoskeleton-extracellular matrix linkage. *Cell*. 10;80(5):675-9. 1995.

CHAEA SY. Protection of insulin secreting cells from nitric oxide induced cellular damage by crosslinked hemoglobin. *Biomaterials*. 25: 843–50. 2004.

DALLE-DONNE I; et al. Protein carbonylation in human diseases. *Trends Mol Med*. 9(4):169-76. 2003.

DANIEL MC; ASTRUC D. Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chemical reviews* 104: 293–346. 2004.

DANGAIN J; VRBOVA G. Muscle development in mdx mutant mice. *Muscle Nerve*. 7(9):700-4. 1984.

DAVIS KL;et al. Novel effects of nitric oxide. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*. 41:203-236. 2001.

DECONINCK N; DAN B. Pathophysiology of duchenne muscular dystrophy: current hypotheses. *Pediatr Neurol*. 36(1):1-7. 2007.

DIAZ J, SERRANO E, ACOSTA F, CARBONELL LF. Reference intervals for four biochemistry analytes in plasma for evaluating oxidative stress and lipid peroxidation in human plasma. *Clin. Chem*. 44:2215-2217. 1998.

DISATNIK MH; et al. Evidence of oxidative stress in mdx mouse muscle: studies of the pre-necrotic state. *J Neurol Sci*. 161:77–84. 1998.

DOHNERT MB; et al. Gold nanoparticles and diclofenac diethylammonium administered by iontophoresis reduce inflammatory cytokines expression in Achilles tendinitis. *Int J Nanomedicine*. 7:1651-7. 2012

DOHNERT MB; et al. Inflammatory cytokines content in Achilles tendinopathy after phonophoresis treatment combined with gold nanoparticles and diclophenac diethylammonium in rats. *Inflammation*. 38(3):1044-9. 2015.

DADUANG J; et al, *Asian Pac. J. Cancer Prev*. 16 (2015) 169.

DUDLEY RW; et al. Dynamic responses of the glutathione system to acute oxidative stress in dystrophic mouse (mdx) muscles. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006;291:R704–10.

DURAN N. et al. *Nanotecnologia: introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação*. 1ª ed. São Paulo. Artliber. 2006.

ESCOBAR-CREDILLO RE; et al. Análisis del patron de interferencia en pacientes con distrofia muscular. *Rev Neurol*.39:517-20. 2004.

EVANS NP; et al. Dysregulated intracellular signaling and inflammatory gene expression during initial disease onset in Duchenne muscular dystrophy. *Am J Phys Med Rehabil*. 88(6):502-22. 2009a.

EVANS NP; et al. Immune-mediated mechanisms potentially regulate the disease time-course of duchenne muscular dystrophy and provide targets for therapeutic intervention. 1(8):755-68. 2009b.

FERREIRA ALA; MATSUBARA LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Ass Med Brasil*. 43(1): 61-8. 1997.

FELSON DT; et al. The comparative efficacy and toxicity of second-line drugs in rheumatoid arthritis. Results of two metaanalyses. *Arthritis and rheumatism* 33: 1449–1461. 1990.

FRIDOVICH I. Oxygen toxicity: a radical explanation. *J. Exp. Biol.* 201:1-15. 1998.

GAO W; et al. Effect of gold nanoparticles on glutathione depletion-induced hydrogen peroxide generation and apoptosis in HL7702 cells. *Toxicol Lett.* 10;205(1):86-95. 2011

GARCIA JC; et al. Radicales libres: impacto médico. *BEB (México)*.13:75-83. 1993.

GHOSH P; et al. Gold nanoparticles in delivery applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* 60:1307-1315. 2008.

GRANGE RW; CALL JA. Recommendations to define exercise prescription for Duchenne muscular dystrophy. *Exer Sport Sci Rev.* 35(1):12-7. 2007.

GROTTO D; et al. Rapid quantification of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography-visible detection. *J Pharm Biomed Anal.* 17;43(2):619-24. 2007

GROUND MD; TORRISI J. Anti-TNF- α (Remicade) therapy protects dystrophic skeletal muscle from necrosis. *FASEB J.*18:668-82. 2004

GROUND MD. The need to more precisely define aspects of skeletal muscle regeneration. *Int J Biochem Cell Biol.* 56:56-65. 2014.

HAINFELD JF; SLATKIN DN; FOCELLA TM; SMILOWITZ HM. Gold nanoparticles: a new X-ray contrast agent. *British journal of radiology* 79: 248–253. 2006.

HALLIWELL B; GUTTERIDGE JMC. *Free Radical in Biology Medicine* University Press, Oxford, NY. 2007.

HALLIWELL B; WHITEMAN M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol.* 142(2):231-55. 2004.

HAUSER E; et al. Oxyradical damage and mitochondrial enzyme activities in the mdx mouse. *Neuropediatrics*. 26(5):260–262. 1995.

HAYCOCK JW; et al. Oxidative damage to muscle protein in Duchenne muscular dystrophy. *NeuroReport* 8(1):357–361. 1996

HODGETTS S; et al. Reduced necrosis of dystrophic muscle by depletion of host neutrophils, or blocking TNF α function with Etanercept in mdx mice. *Neuromuscul Disord*;16:591-602. 2006

LI JJ; et al. Autophagy and oxidative stress associated with gold nanoparticles. *Biomaterials*. 31(23):5996-6003. 2010.

KAMINSKI HJ; ANDRADE FH. Nitric oxide: biologic effects on muscle and role in muscle diseases. *Neuromuscul Disord*. 11(6–7):517–524. 2001.

KARIN M; BEN-NERIAH Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annu Rev Immunol*. 18:621–663. 2000.

KIM JH; et al. Contribution of oxidative stress to pathology in diaphragm and limb muscles with Duchenne muscular dystrophy. *J Muscle Res Cell Motil*. 34(1):1-13. 2013.

KLOMSIRI C; et al. Cysteine-based redox switches in enzymes. *Antioxid Redox Signal*. 15;14(6):1065-77. 2011.

KOSTEK MC; et al. IL-6 signaling blockade increases inflammation but does not affect muscle function in the mdx mouse. *BMC Musculoskelet Disord*. 20;13:106. 2012

KUMAR A; BORIEK AM. Mechanical stress activates the nuclear factor- κ B pathway in skeletal muscle fibers: a possible role in Duchenne muscular dystrophy. *Faseb J*. 17:386–396. 2003.

LADNER KJ; et al. Tumor necrosis factor-regulated biphasic activation of NF-kappa B is required for cytokine-induced loss of skeletal muscle gene products. *J Biol Chem.* 278:2294–2303. 2003.

LAI TH; et al. Gold nanoparticles induce heme oxygenase-1 expression through Nrf2 activation and Bach1 export in human vascular endothelial cells. *Int Jou of Nano.*10: 5925–5939. 2015.

LEVINE RL; et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Meth Enzymol.* 186: 464-478. 1990.

LEVY R; et al. Rational and combinatorial design of peptide capping ligands for gold nanoparticles. *J Am Chem Soc.* 126:10076-10084. 2004.

LOWRY OH; et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193: 265-275. 1951.

Ma JS; et al. Gold nanoparticles attenuate LPS-induced NO production through the inhibition of NF-kappaB and IFN-beta/STAT1 pathways in RAW264.7 cells. *Nitric Oxide.* 1;23(3):214-9. 2010.

MACEDO AB; et al. Low-Level Laser Therapy (LLLT) in Dystrophin-Deficient Muscle Cells: Effects on Regeneration Capacity, Inflammation Response and Oxidative Stress. *PLoS One.* 17;10(6). 2015.

MANZUR AY; KINALI M; MUNTONI F. Update on the management of Duchenne muscular dystrophhy. *Arch Dis Child.* 93(11):986-90. 2008

MARTÍN R; et al. Nano-jewels in biology. Gold and platinum on diamond nanoparticles as antioxidant systems against cellular oxidative stress. *ACS Nano* 4. 6957–6965. 2014.

MESSINA S; et al. Nuclear factor kappa-B blockade reduces skeletal muscle degeneration and enhances muscle function in Mdx mice. *Exp Neurol.* 198:234–241. 2006.

MECHLER F; et al. Lipid peroxidation and superoxide dismutase activity in muscle and erythrocytes in Duchenne muscular dystrophy. *J Neurol Sci.* 63(3):279-83. 1984.

MENDELL JR; ENGEL WK; DERRER EC. Duchenne muscular dystrophy: functional ischemia reproduces its characteristic lesions. *Science* 172(988):1143–1145. 1971

MORAES LH; et al. Reduction of Oxidative Damage and Inflammatory Response in the Diaphragm Muscle of mdx Mice Using Iron Chelator Deferoxamine. *Biol Trace Elem Res.* 167(1):115-20. 2015.

MUKHERJEE P; et al. Antiangiogenic properties of gold nanoparticles. *Clinical cancer research* 11: 3530–3534. 2005.

NEL A; et al. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science.* 3;311(5761):622-7. 2006.

NICHOLS DG; FERGUNSON SJ. *Bioenergetics* 3. Editora Academic Express. 127-129. 2001.

NIE Z; et al. Enhanced radical scavenging activity by antioxidant-functionalized gold nanoparticles: a novel inspiration for development of new artificial antioxidants. *Free Radic Biol Med* 43:1243–54.

NOËL C; et al. Gold nanoparticles induce apoptosis, endoplasmic reticulum stress events and cleavage of cytoskeletal proteins in human neutrophils. *Toxicol In Vitro.* 31:12-22. 2016.

PEDERSEN MO; et al. Metallic gold reduces TNFalpha expression, oxidative DNA damage and pro-apoptotic signals after experimental brain injury. *Brain Res.* 19;1271:103-13. 2009.

PEREIRA DV; et al. Effects of gold nanoparticles on endotoxin-induced uveitis in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 7;53(13):8036-41. 2012.

PODEROSO JJ; et al. Nitric oxide inhibits electron transfer and increases superoxide radical production in rat heart mitochondrial and submitochondrial particles. *Arch Biochem Biophys* 328: 85-92. 1996.

PORTER JD; et al. A chronic inflammatory response dominates the skeletal muscle molecular signature in dystrophin-deficient mdx mice. *Hum Mol Genet.* 1;11(3):263-72. 2002.

QIN WJ; et al. Dimeric gold nanoparticle assembly for detection and discrimination of single nucleotide mutation in Duchenne muscular dystrophy. *Biosens Bioelectron.* 15;25(9):2021-5. 2010.

QUINA FH. Nanotecnologia e o meio ambiente: perspectivas e riscos. *Química Nova.* 27[6]: 1028-1029. 2004.

RANDO TA. Role of nitric oxide in the pathogenesis of muscular dystrophies: a “two hit” hypothesis of the cause of muscle necrosis. *Microsc Res Tech.* 55(4):223–235. 2001.

RAGUSA RJ; CHOW CK; PORTER JD. Oxidative stress as a potential pathogenic mechanism in an animal model of Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 7(6–7):379–386. 1997

ROCHA, FR. Efeitos terapêuticos da iontoforese com nanopartículas de ouro na recuperação de lesão muscular traumática. 2016.76f. Mestrado em Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Santa Catarina, 2016.

SAEMAN MR; et al. Severe burn increased skeletal muscle loss in mdx mutant mice. *J Surg Res.* 15;202(2):372-9. 2016.

SHAVLAKADZE T; et al. Targeted expression of insulin-like growth factor-I reduces early myofiber necrosis in dystrophic mdx mice. *Mol Ther.* 10(5):829-43. 2004.

SHAW IC. Gold-based therapeutic agents. *Chemical reviews.* 99: 2589–2600. 1999.

SILVEIRA PC; et al. Iontophoresis with gold nanoparticles improves mitochondrial activity and oxidative stress markers of burn wounds. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 44:380-5. 2014.

SILVEIRA PC; et al. Effects of phonophoresis with gold nanoparticles on oxidative stress parameters in a traumatic muscle injury model. *Drug Deliv.* 23(3):926-32. 2016.

SLATER TF. Free radical mechanism in tissue injury. *Biochem.J.*222:1-15. 1984

SONAVANE, G; et al. In vitro permeation of gold nanoparticle through rat skin and rat intestine:Effect of particle size. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 65[1]: 1-10. 2008.

SOKOLOV K; et al. Real-time vital optical imaging of precancer using antiepidermal growth factor receptor antibodies conjugated to gold nanoparticles. *Cancer Res* 63:1999-2004. 2003.

SPASSOV A; et al. Histological changes in masticatory muscles of mdx mice. *Arch Oral Biol.* 55(4):318-24. 2010.

SPASSOV A; et al. Increased oxidative stress in dystrophin deficient (mdx) mice masticatory muscles. *Exp Toxicol Pathol.* 63(6):549-52. 2011.

STADTMAN ER; LEVINE RL. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids.* 25(3-4):207-18. 2003.

STEWART MD; et al. Mouse myofibers lacking the SMYD1 methyltransferase are susceptible to atrophy, internalization of nuclei and myofibrillar disarray. *Dis Model Mech.* 1;9(3):347-59. 2016.

SUSSMAN M. Duchenne muscular dystrophy. *J Am Acad Orthop Surg.* 10(2):138-51. 2002.

TANG Y; et al. Inhibition of the IKK/NF- κ B pathway by AAV gene transfer improves muscle regeneration in older mdx mice. *Gene Ther.* 17(12):1476-83. 2010.

TERRILL JR; et al. Taurine deficiency, synthesis and transport in the mdx mouse model for Duchenne Muscular Dystrophy. *Int J Biochem Cell Biol.* 66:141-8. 2015

TERRILL JR, et al. Levels of inflammation and oxidative stress, and a role for taurine in dystropathology of the Golden Retriever Muscular Dystrophy dog model for Duchenne Muscular Dystrophy. *Redox Biol.* 9:276-286. 2016.

TIDBALL JG. Inflammatory processes in muscle injury and repair. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 288(2) 345–353. 2005.

TIDBALL JG; et al. The role of free radicals in the pathophysiology of muscular dystrophy. *J Appl Physiol.* 102:1677–86. 2007.

TORRES LF; DUCHEN LW. The mutant mdx: inherited myopathy in the mouse. Morphological studies of nerves, muscles and end-plates. *Brain.* 110 (Pt 2):269-99. 1987.

TSAI, CY; et al. Amelioration of Collagen-Induced Arthritis in Rats by Nanogold. *Arthritis & Rheumatism.* 56[2]: 544-554. 2007.

TURKEVICH J; et al. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold, *Discuss. Faraday Soc.* 11, 55–60. 1951.

TYLER KL. Origins and early descriptions of Duchenne muscular dystrophy. *Muscle Nerve.* 28(4):402-22. 2003.

UCHIYAMA MK; et al. In vivo and In vitro Toxicity and Anti-Inflammatory Properties of Gold Nanoparticle Bioconjugates to the Vascular System. *Toxi Sci.* 142(2):497–507. 2014.

VICTOR EG; et al. Pulsed ultrasound associated with gold nanoparticle gel reduces oxidative stress parameters and expression of pro-inflammatory molecules in an animal model of muscle injury. *J Nanobiotechnology*. 12;10:11. 2012.

YAKIMOVICH NO; et al. Antioxidant properties of gold nanoparticles studied by ESR spectroscopy. *Rus Chem Bul*. 57, 3: 520—523. 2008.

WEHLING M; et al. A nitric oxide synthase transgene ameliorates muscular dystrophy in mdx mice. *J Cell Biol*. 155(1):123–131. 2001.

WINTERBOURN CC; HAMPTON MB. Thiol chemistry and specificity in redox signaling. *Free Radic Biol Med*. 1;45(5):549-61. 2008.