

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS UFSCAR/UNESP

EFEITOS DE NANOPARTÍCULAS DE OURO SOBRE O TECIDO ÓSSEO, RIM,
FÍGADO E CORAÇÃO DE RATOS

LEANDRO DIAS GONÇALVES RUFFONI

São Carlos

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS UFSCAR/UNESP

EFEITOS DE NANOPARTÍCULAS DE OURO SOBRE O TECIDO ÓSSEO, RIM,
FÍGADO E CORAÇÃO DE RATOS

Dissertação apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas (PIPGCF – UFSCar/UNESP) do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Mestrando: LEANDRO DIAS GONÇALVES RUFFONI

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Keico Okino Nonaka

Co-orientador: Prof. Dr. Valtencir Zucolotto

São Carlos

2012

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

R925en

Ruffoni, Leandro Dias Gonçalves.

Efeitos de nanopartículas de ouro sobre o tecido ósseo, rim, fígado e coração de ratos / Leandro Dias Gonçalves Ruffoni. -- São Carlos : UFSCar, 2013.
69 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2012.

1. Fisiologia. 2. Ossos - fisiologia. 3. Nanopartículas de ouro. 4. Toxicidade. I. Título.

CDD: 612 (20^a)

Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências
Fisiológicas
Associação Ampla UFSCar/UNESP

Folha de Aprovação

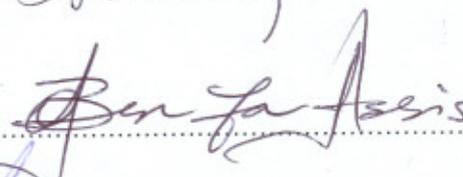
Dissertação de Mestrado de Leandro Dias Gonçalves Ruffoni

Dia 05/07/2012

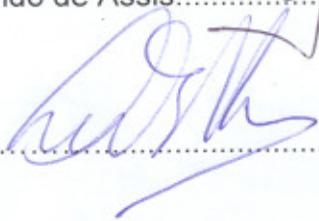
Prof^a. Dr^a. Keico Okino Nonaka.....



Prof. Dr. Odílio Benedito Garrido de Assis.....



Prof. Dr. Darnival Bertoncello.....



DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus por TUDO, meus avós pela educação e amor, aos meus pais pelo amor incondicional e apoio irrestrito em tudo, à minha irmã, cunhado e sobrinha, a todos meus parentes, amigos e professores acadêmicos e da vida que de alguma forma contribuíram para a chegada deste momento tão especial. Amo todos Vocês.

AGRADECIMENTOS

Louvo a Jesus Cristo pela misericórdia e sustento, sempre me amparando.

A minha mãe e meu pai, que sempre tiveram paciência e me apoiando em todos os momentos do mestrado e de minha vida.

A minha irmã Lilliam, cunhado Diego e sobrinha Camilinha, pela solidariedade, apoio e por segurarem muito das minhas “buchas”.

A minha orientadora e mãe científica Profa. Keico Okino Nonaka, por abrir as portas do laboratório e de sua casa, dando-me uma oportunidade única e pela confiança na realização deste trabalho.

Ao meu irmão de fé e de longas histórias, Fernando Vidal D’Ávila, o FOGUIM, pela amizade, exemplo de camaradagem e por tudo que fez por mim. Afinal, você foi o “responsável” pela minha vinda para São Carlos, só Deus para lhe retribuir.

Aos amigos (gurus) e irmãos científicos, Charles e Fábio Pastor pela amizade, ajuda, conselhos e paciência desde o meu primeiro contato aqui no laboratório.

Aos amigos de Laboratório, Val, Fabim, Zezim, Beizola e seu Sérgio pela boa vontade de sempre.

Aos meus amigos e parceiros do Centro de Convenções Casa dos Artistas, Salsicha, Djava e Zé Neto, pelo companheirismo, paciência e diversããããã!!!!

Aos parceiros do Instituto de Física da USP/São Carlos, Prof. Valtencir Zucolotto e Valerinha.

Ao pessoal do departamento de Ciências Fisiológicas, em especial o da “ Faixa de Gaza” (Carol, Dani, Cíntia, Lívia e companhia) e do “Aquário” por me receberem tão bem.

A todos os amigos e pessoas que não participaram diretamente deste trabalho, mas que me ajudaram com incentivo, apoio, compreensão e amizade.

Muito Obrigado!!

“Um homem nunca sabe do que é capaz até que é obrigado a tentar”

Charles Dickens.

RESUMO

O processo de formação e remodelamento do tecido ósseo é influenciado por diversos fatores tais como hormonais, alimentação, genética, sexo, idade, doenças intercorrentes e fatores ambientais. Há relatos na literatura da atuação de nanopartículas sobre o desenvolvimento e remodelamento ósseo e de sua influência sobre rim, fígado e coração. O objetivo deste estudo foi analisar possíveis influências da exposição de nanopartículas de ouro (AuNPs) sobre o tecido ósseo, rim, fígado e coração. Após uma única exposição intravenosa, foram analisados parâmetros biométricos, biofísicos e biomecânicos ósseos de ratos adultos e o peso úmido do rim, coração e fígado. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos (uma semana, um mês e dois meses), subdivididos em quatro, os quais foram tratados respectivamente com polímero poliaminoamida (PAMAM), PAMAM + AuNPs, Citrato (tampão citrato) e Citrato + AuNPs. As nanopartículas de ouro foram administradas em dose única (0,01 mg Au/kg MC), via veia jugular. As propriedades biomecânicas dos fêmures foram obtidas pelo teste de flexão a três. Não houve diferenças significativas dos diferentes parâmetros ósseos e massa dos órgãos entre os grupos nos seus respectivos períodos de tratamento. Portanto, os resultados apontam que a dose de AuNPs utilizada neste estudo não prejudicou a qualidade do tecido ósseo assim como a massa dos órgãos. Estes resultados podem auxiliar no entendimento de possíveis ações de AuNPs sobre o tecido ósseo e dos órgãos.

Palavras chave: Nanopartículas de ouro; toxicidade, tecido ósseo; rim; fígado; coração.

ABSTRACT

The process of formation and remodeling of bone tissue is influenced by several factors such as hormones, nutrition, genetics, sex, age, intercurrent disease and environmental factors. There are published reports of the performance of nanoparticles on the development and bone remodeling, and also on kidney, liver and heart. The objective of this study was to analyze the possible influence of gold nanoparticle (AuNPs) exposure on bone tissue and on kidney, heart and liver. After a single intravenous AuNPs exposure biometric, biophysical and biomechanical bone parameters of adult rats were analyzed. The animals were randomly distributed into three groups (1 week, 1 month and 2 months), divided into four, which were respectively treated with polymer poliaminoamida (PAMAM), PAMAM + AuNPs, citrate (citrate buffer) and citrate + AuNPs. Gold nanoparticles were administered by a single dose (0,01 mg Au/kg MC), via the jugular vein. The biomechanical properties of femurs were obtained by the three point bending test. The mass of the kidney, liver and heart were also analyzed. There were no significant differences of the different bone parameters and organs weights among the groups in their respective treatment periods. Therefore, the results indicated that the dose of AuNPs used in this study did not impair the quality of bone tissue as well as the organ weights. These results may help in understanding the possible actions of AuNPs on the bone tissue and organs.

Keywords: Gold nanoparticles; toxicity; bone; kidney; liver; heart.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

N&N	Nanociência e Nanotecnologia
NPs	Nanopartículas
nm	nanômetro
NMs	Nanomateriais
AuNPs.....	Nanopartículas de ouro
a.C.....	antes de Cristo
SPR.....	Ressonância de Superfície de Plasmon
PAMAM	Poliaminoamina
HIV	Human immunodeficiency virus
HAuCl ₄	ácido cloroáurico
PTH.....	Hormônio da paratireóide
IL-1	Interleucina-1
IL-6	Interleucina-6
TNF.....	Fator de Necrose Tumoral
µg.....	micrograma
MC	Massa Corporal
Gpx-1	Glutathione peroxidase
PEG.....	Polietileno-glicol
O ₂	Oxigênio
KCS	Células de Kupffer
<i>i.v</i>	intravenosa
TEM.....	Microscopia Eletrônica de Transmissão
g	grama

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Aplicações da Nanotecnologia.....	13
Figura 2- Rotas de Exposição Humana e liberação de NPs no ambiente	16
Figura 3- Nanopartículas de Ouro	19
Figura 4- Distribuição dos animais (1 semana, 1 mês e 2 meses).	33
Figura 5- Tratamento intravenoso (veia jugular)	34
Figura 6- Espectro de Absorção	36
Figura 7- Máquina de Ensaio INSTRON	37
Figura 8- Gráfica Carga x Deformação	39
Figura 9 - Massa corporal (g) inicial e final dos animais (1 semana).....	44
Figura 10 - Massa corporal (g) inicial e final dos animais (1 mês)	44
Figura 11 - Massa corporal (g) inicial e final dos animais (2 meses).....	45
Figura 12 - Parâmetros Biométricos (1 semana de tratamento)	49
Figura 13 - Parâmetros Biofísicos (1 semana de tratamento).....	49
Figura 14 - Parâmetros Biomecânicos (1 semana de tratamento)	50
Figura 15 - Parâmetros Biométricos (1 mês de tratamento)	50
Figura 16 - Parâmetros Biofísicos (1 mês de tratamento)	51
Figura 17 - Parâmetros Biomecânicos (1 mês de tratamento).....	51
Figura 18 - Parâmetros Biofísicos (2 meses de tratamento)	52
Figura 19 - Parâmetros Biofísicos (2 meses de tratamento)	52
Figura 20 - Parâmetros Biomecânicos (2 meses de tratamento).....	53
Figura 21 - Massa do rim, fígado e coração dos animais (1 semana).....	55
Figura 22 - Massa do rim, fígado e coração dos animais (1 mês).....	55
Figura 23 - Massa do rim, fígado e coração dos (2 meses).	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Massa Corporal Inicial e Final dos animais (1 semana, 1 mês e 2 meses....	43
Tabela 2 - Parâmetros Biométricos, Biofísicos e Biomecânicos dos fêmures (1semana)..	46
Tabela 3 - Parâmetros Biométricos, Biofísicos e Biomecânicos dos fêmures (1 mês).....	47
Tabela 4 - Parâmetros Biométricos, Biofísicos e Biomecânicos dos fêmures (2 meses)...	48
Tabela 5 - Massa do rim, fígado e coração dos animais (1 semana)	53
Tabela 6 - Massa do rim, fígado e coração dos animais (1 mês).....	54
Tabela 7 - Massa do rim, fígado e coração dos animais (2 meses)	54

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	12
1.1.	Nanociência/Nanotecnologia (N&N)	12
1.2.	Nanotoxicologia	15
1.3.	Exposição	17
1.4.	Nanopartículas de ouro (AuNPs)	18
1.5.	Estabilizantes (PAMAM / Citrato).....	21
1.5.1.	Dendrímeros	21
1.5.2.	Citrato.....	22
1.6.	Fatores complicadores na investigação toxicológica dos NMs	23
1.7.	Avaliação <i>IN VITRO</i>	24
1.8.	Avaliação <i>IN VIVO</i>	25
1.9.	Tecido ósseo	25
1.10.	Rim.....	28
1.11.	Fígado	29
1.12.	Coração	30
2.	OBJETIVOS.....	32
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1.	Animais e Condições Experimentais	33
3.2.	Grupos Experimentais	33
3.3.	Coleta do tecido ósseo.....	34
3.3.1.	Coleta dos órgãos	34
3.4.	Preparo de AuNPs	35
3.5.	Protocolo de Análises.....	36
3.5.1.	Medidas do comprimento do fêmur direito.....	36
3.5.2.	Medidas das espessuras das diáfises femorais.....	36
3.5.3.	Parâmetros Biomecânicos	36
3.5.3.1.	Carga Máxima (N).....	38
3.5.3.2.	Resiliência (J).....	38
3.5.3.3.	Rigidez (N/mm).....	38
3.5.4.	Parâmetros Físicos	39
3.6.	Peso dos Órgãos	41

4.	Análise Estatística	42
5.	RESULTADOS	43
5.1.	Massa Corporal	43
5.2.	Parâmetros Biométricos, Biofísicos e Biomecânicos.....	45
5.3.	Peso Úmido dos Órgãos	53
6.	DISCUSSÃO.....	57
7.	CONCLUSÕES	60
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

1. INTRODUÇÃO

1.1. Nanociência/Nanotecnologia (N&N)

As nanopartículas (NPs) surgiram a partir de uma ciência emergente, a nanociência, que pode ser definida como o estudo dos fenômenos e manipulação de materiais em níveis atômico, molecular e supramolecular, onde as propriedades físico-químicas podem diferir significativamente daquelas em maior escala. (MELO & PIMENTA, 2004).

A nanotecnologia envolve a criação e o manejo de materiais em escala nanométrica, ou seja, um bilionésimo do metro (10^{-9}), entre 1-100 nanômetros (nm) (Esteves, Timmons & Trindade, 2004), englobando as ciências de engenharia, física, química, biologia, informática e medicina. O tamanho em que diversas estruturas alteram suas propriedades físico-químicas não é um valor limitante, mas que provavelmente difere de um composto para outro. No entanto, para efeitos de regulação, o limiar de 100 nm é o valor considerado padrão para as NPs (DE JONG *et al.*, 2008).

Com estas novas propriedades, os nanomateriais (NMs) são utilizados para melhorar a funcionalidade de produtos comerciais e bens de consumo, tais como, protetores solares, cosméticos, roupas, materiais de construção, produtos alimentícios, de higiene e agrícolas, inovando também as áreas da eletrônica, informática, biomédica, farmacêutica, ambiental, energética, indústria automobilística e bélica (COLVIN, 2003; DROBNE, 2007). Como ilustrado pela figura 1.

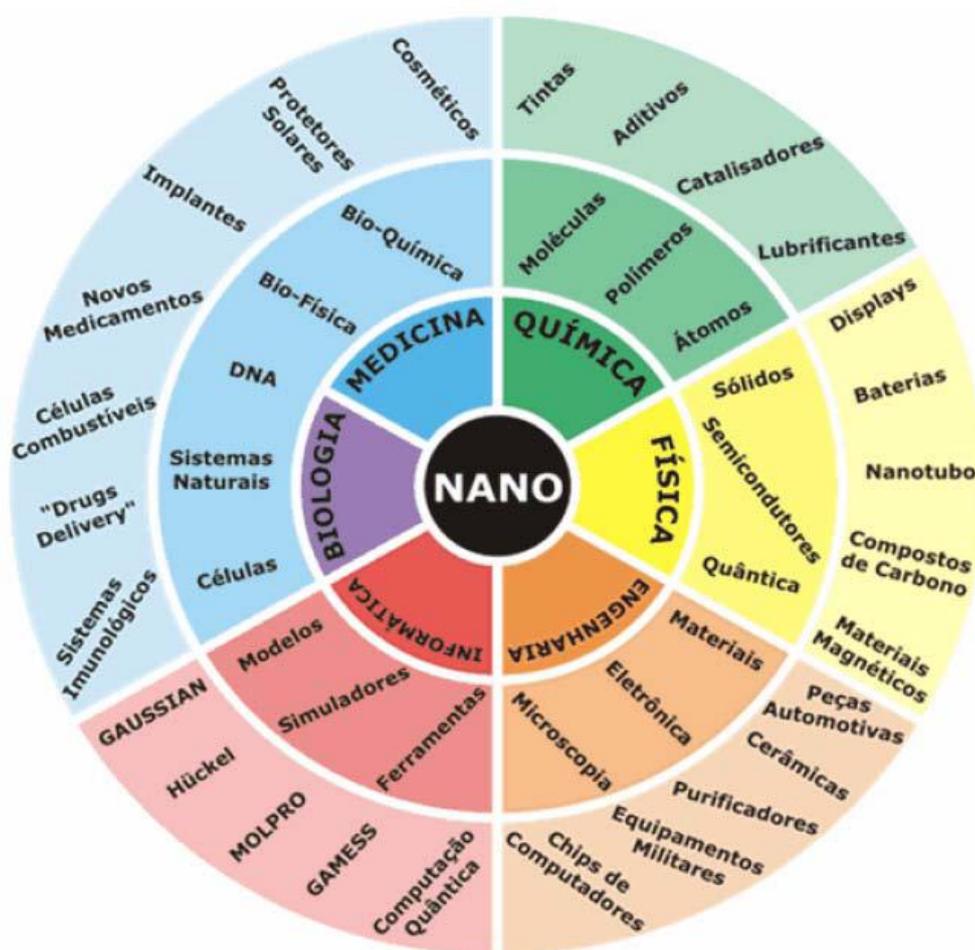


Figura 1 - Síntese de Aplicações das Nanotecnologias em contexto de Convergência Tecnológica (SMITH, GAO & NIE, 2004).

Em termos globais, a área de pesquisa em nanotecnologia tem atraído mais investimentos públicos do que qualquer outra área de tecnologia isolada, com cifras da ordem de U\$ 8 bilhões em 2008. Saliente-se, ainda, que em países, como os da União Européia, os Estados Unidos e Japão, os investimentos privados superam os investimentos públicos (REPORT, 2008). Ainda no campo econômico, ROCO, (2001) prevê que a produção industrial anual de NMs deverá exceder um trilhão de dólares, entre 2010 e 2015, empregando aproximadamente dois milhões de trabalhadores.

Outra informação contundente diz respeito à produção global de todos os NMs, que foi de aproximadamente 2.000 toneladas em 2010 e estima-se que este valor deverá ser de 13.000 toneladas por ano até 2020 (ENGINEERING, 2004).

No Brasil, os investimentos deverão atingir nos próximos três anos, R\$ 110 milhões na área, segundo o Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação.

Como citado, os avanços em nanotecnologia são promissores para muitas aplicações biológicas e biomédicas, tendo seus potenciais benefícios para a saúde humana relatados na literatura (COLVIN, 2003).

A aplicação da nanotecnologia à medicina, conhecida como nanomedicina, diz respeito à utilização de materiais produzidos em escala nanométrica para desenvolver novas modalidades terapêuticas e de diagnóstico, devido às suas propriedades físico-químicas únicas, tais como: o seu tamanho extremamente reduzido, grande relação de massa / área de superfície e elevada reatividade, diferindo-os dos materiais da mesma composição em escala maiores. Estas propriedades podem ser utilizadas para transpor algumas das limitações encontradas nos agentes terapêuticos e de diagnósticos tradicionais (EL-ANSARY & AL-DAIHAN, 2009).

O campo promissor da nanomedicina é o potencial de reparação, construção e controle de sistemas biológicos humanos a nível molecular (OBERDORSTER, OBERDORSTER & OBERDORSTER, 2005; BORM *et al.*, 2006), interagindo facilmente com biomoléculas na superfície e no interior das células, sem alterar o comportamento e as propriedades das mesmas (BISWAS & WU, 2005).

A diferença entre a nanomedicina e a medicina com drogas convencionais é que a primeira é inteiramente baseada na química de moléculas com tamanho extremamente reduzido, abrangendo não apenas os agentes terapêuticos em si, mas também com a perspectiva de modificar a capacidade de entregar estes agentes para os tecidos, células ou regiões específicas do corpo e até mesmo locais específicos dentro das próprias células (KIPEN & LASKIN, 2005).

Nesta ótica, o potencial das NPs na melhoria da saúde humana, vem sendo reconhecida, por exemplo, como uma ferramenta multifuncional para o diagnóstico, prevenção e tratamento de câncer (NCI ANNOUNCES MAJOR COMMITMENT TO NANOTECHNOLOGY FOR CANCER RESEARCH, 2004).

No entanto, apesar dos benefícios estimados pelo uso dos nanomateriais nos campos biomédico e industrial, muito pouco se conhece sobre os potenciais efeitos deletérios destes a curto e longo prazo à saúde humana e ao meio ambiente (COLVIN, 2003; MAYNARD *et al.*, 2006; NEL *et al.*, 2006; HELMUS, 2007). Especificamente, há uma escassez de informações sobre o efeito do tamanho, forma, área de superfície e dos grupos funcionais dos NMs sobre a biodisponibilidade, absorção, distribuição intracelular, metabolismo, degradação e eliminação destes nanomateriais (CONNOR *et al.*, 2005).

Considerando que há atualmente no mercado uma significativa quantidade de produtos (cosméticos, alimentos, brinquedos, artigos infantis, materiais de embalagem e muitos outros bens de consumo) contendo algum tipo de NPs em sua composição, gerou-se a preocupação de que a exposição dos seres humanos a certos tipos de NPs poderia promover riscos à saúde, além dos efeitos ambientais destes NMs sobre o ecossistema que supostamente levariam a significativas implicações sociais, podendo representar um importante obstáculo ao desenvolvimento e à comercialização destes produtos com conteúdo nanotecnológico.

Seguindo este raciocínio, os investimentos em pesquisas relacionadas aos impactos das nanotecnologias à saúde e segurança humana, ainda que em montantes bem menores do que os destinados aos desenvolvimentos destas têm crescido de forma consistente. Assim, o 7º European Union Framework Program, direcionado aos temas N&N, destinará 15% de seus recursos totais (cifra equivalente a 54,7 milhões de Euros) no período 2008-2015 em projetos direcionados ao entendimento da toxicidade das nanotecnologias (REPORT, 2008).

1.2.Nanotoxicologia

Ressaltado por LEI *et al.* (2008), para uma aplicação bem sucedida dos NMs na biociência, torna-se importante compreender o destino biológico e a sua possível toxicidade, uma vez que riscos inerentes a qualquer nova tecnologia são reconhecidos.

As questões sobre os efeitos colaterais dos produtos com nanotecnologia são pertinentes, visto que o potencial de exposição às NPs aumentará com o crescimento da produção e utilização destes pela sociedade. Como resultado de todos estes debates e preocupações, um novo ramo de pesquisa toxicológica emergiu com o objetivo de investigar os possíveis efeitos nocivos à exposição de NMs (OBERDORSTER, OBERDORSTER & OBERDORSTER, 2005; NEL *et al.*, 2006).

A nanotoxicologia, que se refere ao estudo das interações adversas induzidas por nanoestruturas sobre os sistemas biológicos (RYMAN-RASMUSSEN, RIVIERE & MONTEIRO-RIVIERE, 2007), elucidando as relações entre as propriedades físicas e químicas (tamanho, forma, superfície química, composição e agregação) destas nanoestruturas com a indução de respostas biológicas tóxicas (OBERDÖRSTER, STONE & DONALDSON, 2007). Além disso, está envolvida com a proposição de protocolos confiáveis para avaliação de riscos em humanos e ao meio ambiente (DROBNE, 2007). A seguir, pode-

se observar pela figura 2, o esquema das possíveis rotas de exposição humana e liberação de NPs para o meio ambiente.

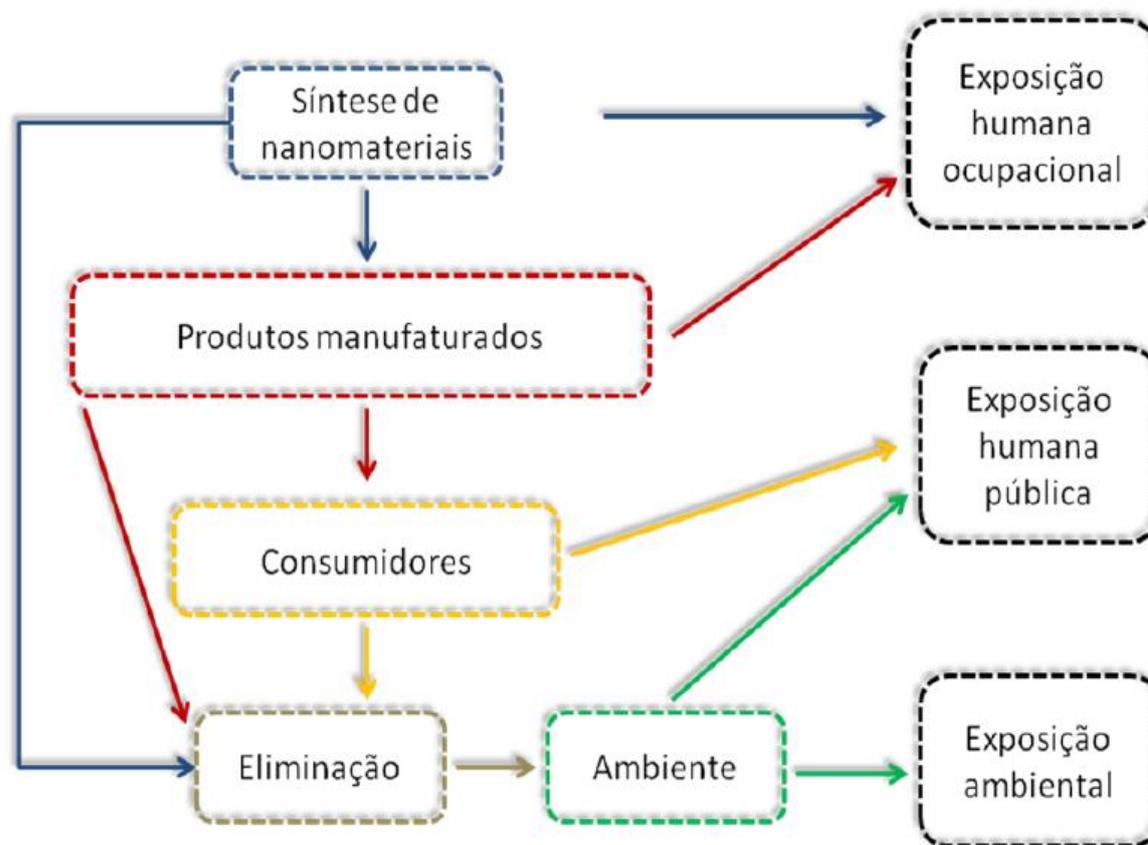


Figura 2 - Rotas de exposição humana e liberação de NPs para o meio ambiente. (SILVA *et al.*, 2012)

Como mencionado, a necessidade desta área de investigação tornou-se ainda mais evidente após a ampla aplicação da nanotecnologia à engenharia, indústria farmacêutica e medicina. Recentemente, vários estudos têm se concentrado na questão da segurança dos NMs manufaturados com o intuito de minimizar ou prevenir sua nanotoxicidade antes mesmo de serem amplamente utilizados (HOET, BRUSKE-HOHLFELD & SALATA, 2004; OBERDORSTER, OBERDORSTER & OBERDORSTER, 2005; WIESNER *et al.*, 2006).

Outros estudos sugerem que o perfil de toxicidade destas NPs é realmente diferente em comparação com partículas em escala maiores (COLVIN, 2003; MAYNARD *et al.*, 2006; NEL *et al.*, 2006; HELMUS, 2007; DE JONG *et al.*, 2008; LEWINSKI, COLVIN & DREZEK, 2008).

Neste âmbito LEWINSKI, COLVIN & DREZEK (2008), em uma revisão de literatura, relataram um número crescente de pesquisas publicadas na última década voltadas

para esta questão, buscando a compreensão das interações entre os diferentes tipos de NPs e funções celulares.

Apesar deste aumento em publicações voltadas à toxicidade ou toxicologia de NMs, ainda há uma acentuada discrepância na razão entre artigos publicados que apresentavam tópicos de nanotecnologia, NMs ou NPs (172.599) e os que abordam a questão da nanotoxicologia (22.381), situação que pode ser visualizada na base de dados (DIRECT, 2011).

Nesta ótica, (STERN & MCNEIL, 2008) apontam a toxicologia dos NMs como uma nova fronteira em toxicologia, uma vez que o conhecimento atual sobre os potenciais efeitos adversos das NPs ainda é insuficiente.

Infelizmente, a partir das pesquisas disponíveis não existem conclusões simples, devido à variabilidade de parâmetros, tais como, propriedades físico-químicas, tipo de partícula e célula, animais, dosagem e ensaios utilizados (ALKILANY & MURPHY, 2010).

1.3.Exposição

Apesar de não haver relatos de doenças em humanos atribuídas às NPs, estudos experimentais indicam que elas poderiam iniciar respostas biológicas adversas levando a possíveis resultados toxicológicos (EL-ANSARY & AL-DAIHAN, 2009). Atualmente, os dados estatísticos mostram que mais de 1000 produtos ou linhas de produtos disponíveis no mercado já utilizam a nanotecnologia em sua produção (JONES & GRAINGER, 2009; HSIAO & HUANG, 2011). Considerando estes dados e as incertezas a respeito do comportamento das NPs no organismo humano, mais estudos sobre sua biodistribuição e efeitos fazem-se necessários (THOMAS *et al.*, 2006; DE JONG *et al.*, 2008).

Embora os componentes destes produtos em escala nanométrica são ligados ao material, e não de uma forma livre, há também a possibilidade de liberação destes durante o desgaste do próprio material. A exposição aos NMs pode ocorrer com os trabalhadores que atuam na área da nanotecnologia (no desenvolvimento, fabricação, manipulação ou transporte) e com os consumidores durante a utilização ou após a eliminação dos NMs.

A dinâmica geral das nanoestruturas pode ser resumido da seguinte forma: (1) as nanoestruturas podem entrar no organismo através de seis vias principais: intravenosa, intraperitoneal, subcutânea, dérmica, inalação e oral (RYMAN-RASMUSSEN, RIVIERE & MONTEIRO-RIVIERE, 2007); (2) a absorção pode ocorrer quando as nanoestruturas

interagem primeiramente com componentes do sangue (proteínas, células), (3) em seguida, elas podem se distribuir por vários órgãos no organismo, podendo permanecer estruturalmente a mesma, serem modificadas ou metabolizadas (BORM *et al.*, 2006); (4) podem entrar e residir nas células dos órgãos por um tempo ainda desconhecido antes de deixá-los e se deslocarem para outros órgãos ou serem excretados. Contudo, pouco se sabe sobre o real potencial tóxico destes NMs em contato com organismo humano.

1.4.Nanopartículas de ouro (AuNPs)

Os mais antigos registros sobre o uso medicinal do ouro vêm da Alexandria no Egito, há 5.000 anos, onde eles ingeriam ouro para a purificação da mente, corpo e espírito. Acreditavam que o ouro no corpo atuava na estimulação da vida.

Na sua forma natural, o ouro tem sido considerado um metal nobre e quimicamente inerte, com algumas propriedades terapêuticas (CONNOR *et al.*, 2005). Embora recomendado para cura de várias doenças ao longo dos séculos até os dias de hoje, seus mecanismos de ação ainda são pouco compreendidos, sendo que nos últimos 50 anos, foi utilizado principalmente em implantes dentários (PATRA *et al.*, 2007) e no tratamento de pessoas com artrite reumatóide, atuando como agentes anti-inflamatórios e anti-reumáticos (auranofina® e tauredon®) (MURPHY *et al.*, 2008). Nesta vertente, tem sido observado um avanço da utilização de NPs metálicas, em especial, de ouro.

Apesar das controvérsias, os primeiros registros a retratar a existência de partículas de ouro em dimensões extremamente reduzidas datam cerca de 400 a.C, como a taça de Licurgus (MUSEUM, 2012), manufaturada por um vidreiro romano, que exibe uma peculiar coloração esverdeada quando visualizada por reflexão e vermelha quando visualizada por transmissão de luz. Tal efeito seria devido às nanopartículas de ouro (AuNPs) incorporadas à estrutura da taça.

O primeiro artigo científico sobre AuNPs, atribuindo a cor vermelha com a natureza coloidal foi descrito no século XIX. Esta cor é o resultado da interação de elétrons de condução na banda metálica das NPs com o vetor do campo elétrico da luz incidente que acomoda os elétrons na superfície (plasmons de superfície) (FARADAY, 1857).

A seguir, a figura 4 exibe três estados físicos do ouro (sólido, suspensão aquoso e diluído em nanopartículas).



Figura 3 - Ilustrando o ouro na sua forma natural (à esquerda); fonte: <http://valorreal.blogs.sapo.pt/514.html>, em suspensão aquosa e diluída em nanopartículas (à direita); fonte: http://www.imagens.usp.br/?attachment_id=12624.

Muitas aplicações das AuNPs nas ciências de materiais e tecnologia, incluindo biologia e nanomedicina, foram descritas (BOISSELIER & ASTRUC, 2009).

O grupo de CHO *et al.* (2010) discorreram que, devido à sua facilidade de síntese, modificação, biocompatibilidade, estabilidade e facilidade de incorporação de grupos funcionais, as AuNPs têm sido propostas para aplicações biomédicas, tais como: (a) agentes fototérmicos localizadores que medeiam necrose de células tumorais a partir da irradiação com luz à laser, proporcionando grandes quantidades de energia tóxica às células alvo; (b) como agentes de contraste para imagens médicas, oferecendo vantagens físicas e farmacocinéticas sobre os agentes convencionais, proporcionando maior contraste e tempo de imagem (HAINFELD *et al.*, 2006).

Além disso, as AuNPs apresentam algumas propriedades ópticas, tais como, ressonância de plasma, que é um fenômeno essencialmente quântico operado em nanoescala, significando uma atuação de grande interesse no estudo de alguns eventos biomoleculares, incluindo o dobramento de proteínas (PATRA *et al.*, 2007), vetores e entrega de drogas e de gene/DNA, para o tratamento de diversas doenças (Câncer, Alzheimer, HIV, Hepatite, Tuberculose, Artrite e Diabetes) (BOISSELIER & ASTRUC, 2009).

As qualidades das AuNPs foram reforçadas por SHAN & TENHU (2007), que explanaram sobre estas propriedades ópticas únicas, por exibirem forte absorção de ondas eletromagnéticas na faixa visível, devido à ressonância de plasmon de superfície (SPR), que é causada pela oscilação de elétrons condutores sobre as superfícies metálicas após a irradiação pelas ondas eletromagnéticas. O pico de absorção do comprimento de onda depende de muitos fatores como, potencial dielétrico, tamanho da partícula e a distância entre as mesmas.

As AuNPs também foram estudadas como um agente de contraste vascular exibindo alta atenuação de raios-x, estabilidade e biocompatibilidade (ZHANG, ROSS & ROEDER,

2010). Recentemente, a equipe de ZHANG *et al.* (2011) propuseram o uso de AuNPs como uma nova técnica de radiosensibilizador em radioterapia, devido à sua forte absorção eletrônica e irradiação fotoelétrica secundária causada por raios x e gama, que pode acelerar a quebra de cadeias de DNA.

As NPs esféricas possuem um pico de plasmon a cerca de 520 nm, que não se desloca extensivamente na mudança de tamanho e no índice de refração do meio circundante (HU *et al.*, 2006; RAYAVARAPU *et al.*, 2007; ROONEY *et al.*, 2008), podendo ser sintetizadas em vários tamanhos e meios, de acordo com a aplicação desejada. São versáteis e facilmente funcionalizadas (introdução de substâncias no interior das NPs melhorando sua ação, é certamente uma das mais fascinantes possibilidades de modificação desse tipo de estrutura) com pequenas moléculas de drogas, polímeros e biomateriais (ROTH E THEAGO, 2008).

A promessa das AuNPs para muitas aplicações biológicas tem levado a um forte interesse em estudar o seu potencial de causar efeitos deletérios em sistemas biológicos (ALKILANY & MURPHY, 2010).

Apesar das vantagens oferecidas por elas no campo industrial e principalmente biomédico, pouco se conhece de seus possíveis efeitos tóxicos e de sua biodisponibilidade nos tecidos vivos.

Estudos têm sugerido as AuNPs como não tóxicas (CONNOR *et al.*, 2005; SHUKLA *et al.*, 2005). Em contrapartida, outros relatam sua toxicidade, que foi apresentada por derivar da dimensão física, química de superfície e forma (GOODMAN *et al.*, 2004; PERNODET *et al.*, 2006; CHITHRANI & CHAN, 2007; PAN *et al.*, 2007).

Um grande número de materiais reconhecidos como não-tóxicos em sua forma natural, pode tornar-se perigoso quando o seu tamanho é reduzido à escala nanométrica. No entanto, na visão de Chen *et al.* (2009) a toxicidade das NPs pode ser provocada mais pela sua peculiar química de superfície e menos pela redução do seu tamanho em si, podendo resultar em um aumento de reatividade com os sistemas biológicos. Ainda foram acrescentadas as propriedades cinéticas das NPs como um importante fator para o potencial de toxicidade em humanos (DE JONG *et al.*, 2008).

Contudo, junto aos benefícios apontados, as AuNPs também são suspeitas de representar um potencial risco para a saúde.

1.5. Estabilizantes (PAMAM / Citrato)

Partindo do pressuposto de que as AuNPs puras são inertes e sua utilização não provocaria resposta celular, os possíveis efeitos deletérios de seu uso poderia ser induzidos pelo grupo de conjugados químicos ou biomoléculas anexadas à sua superfície.

As AuNPs empregadas na área biomédica podem ser preparadas e estabilizadas com uma variedade de estabilizantes (citrato, polímeros, dendrímeros, surfactantes), incluindo biomoléculas como os oligonucleotídeos e DNA (BOISSELIER & ASTRUC, 2009).

1.5.1. Dendrímeros

Dendrímeros são moléculas construídas por meio de um crescimento radial às camadas de forma repetitiva, a partir de um núcleo polifuncionalizado, sendo o número de unidades de monômeros incorporado a cada camada sucessivamente dobrado ou triplicado em relação ao do ciclo anterior. A estrutura dendrítica resultante é altamente ramificada e com um grande número de grupamentos funcionais na superfície. A molécula gerada na primeira série de reações é denominada dendrímero de primeira geração, quando acrescida de mais uma camada por intermédio de uma segunda série de reações, dendrímero de segunda geração, e assim por diante, como por exemplo, o dendrímero poliaminoamida (PAMAM).

Durante as últimas três décadas, os dendrímeros PAMAM e outros têm sido amplamente utilizados como veículos para entrega de drogas ou gene (PISTOLIS *et al.*, 1999; AGASHE *et al.*, 2006).

Entretanto, RITTNER *et al.* (2002); HONG *et al.* (2004) advertem que uma possível toxicidade *in vivo* dos dendrímeros ainda não foi sistematicamente investigada, pois dependendo do tipo e geração, transportam carga positiva, negativa ou neutra sobre sua superfície. Uma vez inseridos na circulação sistêmica, os dendrímeros carregados positivamente e macromoléculas catiônicas interagiriam com componentes do sangue, desestabilizando as membranas celulares, culminando em lise celular.

Estudos de toxicidade aguda e crônica de dendrímeros poliamidoamina (PAMAM) catiônicos das gerações G3, G5 e G7 com doses diversas entre 0,026 a 45 mg/Kg da massa corporal, de uma e dez aplicações (por semana) intraperitoniais em ratos, não observaram alterações significativas da massa corporal e do comportamento dos animais,

sugerindo que dendrímeros catiônicos de baixa geração não causariam efeitos adversos mesmo em doses elevadas (ROBERTS, BHALGAT & ZERA, 1996; HONG *et al.*, 2004).

Em contrapartida, HEIDEN *et al.*, (2007) observaram que dendrímeros catiônicos PAMAM (G4, amina terminal) nas concentrações acima de 20 μ M foram tóxicos para embriões de peixe-zebra, e a toxicidade foi dependente da dose e do tempo de exposição.

1.5.2. Citrato

Citrato de sódio ou citrato trissódico é o sal de sódio do ácido cítrico, usado principalmente como um aditivo alimentar ou como conservante, sendo também utilizado como anticoagulante em tubos de coleta de sangue.

Como uma base conjugada de um ácido fraco, o citrato pode formar um agente tamponador. Um dos principais métodos para a síntese de AuNPs, é o desenvolvido por (TURKEVICH, STEVENSON & HILLIER, 1951), que consiste em utilizar o citrato para promover a redução de íons de ácido cloroáurico (HAuCl₄) em água. Dessa maneira, as AuNPs formadas ficam estabilizadas por meio de repulsões eletrostáticas e pelos íons citrato, que além de participarem do processo de redução, atuam na passivação das AuNPs, evitando a agregação das mesmas.

Estudos têm demonstrado o amplo uso do citrato para estabilizar AuNPs sem provocar efeitos tóxicos. Utilizando AuNPs esféricas com diâmetros de 4, 12 e 18nm e diversos agentes estabilizantes, entre eles o citrato, não observaram indícios de toxicidade em uma linhagem de células leucêmicas (CONNOR *et al.*, 2005).

Em concordância, DOBROVOLSKAIA *et al.* (2009) relataram que AuNPs esféricas cobertas com citrato, com tamanhos de 30 e 50 nm, serem compatíveis com o sangue e não induziram qualquer agregação plaquetária, alteração do tempo de coagulação ou da resposta imune.

AuNPs tamponadas com citrato com 13nm de diâmetro, foram apontadas serem tóxicas em linhagem de células de carcinoma de pulmão, mas não em linhagem de células de carcinoma de fígado humano, usando a mesma dosagem. (PATRA *et al.*, 2008). Existem resultados demonstrando que AuNPs cobertas com citrato seriam uma nova classe de agentes fototérmicos, causando lesão e morte celular (RAJI *et al.*, 2011).

Em contrapartida, foram observados que níveis elevados de AuNPs revestidas com citrato permanecem constantes durante 24 horas pós tratamento, sendo pobremente eliminadas

(MORAIS *et al.*, 2012). Esta situação também foi anteriormente descrita por BALASUBRAMANIAN *et al.* (2010) em um estudo com ratos, que constataram que AuNPs tamponadas com citrato permaneceram nos órgãos dos animais por até 2 meses.

1.6. Fatores complicadores na investigação toxicológica dos NMs

A determinação de uma dose de NMs para uma investigação toxicológica é muito complexa quando comparada a agentes tóxicos químicos convencionais, pois a concentração e verificação da dose destes são relativamente simples, baseando-se na caracterização das composições e pureza do material testado, mas com as NPs esta determinação vai além da química natural do material. Portanto, uma variedade de outros atributos deve ser considerada, incluindo o tamanho, forma, cristalinidade, porosidade, rugosidade da superfície, solubilidade, área de superfície, estado de dispersão química e muitas outras propriedades físico-químicas (POWERS *et al.*, 2006).

Entre todos, quatro parâmetros físicos são considerados relevantes para avaliar a toxicidade das NPs: concentração, tamanho, forma e área de superfície (MAYNARD *et al.*, 2006).

Como mencionado, o tamanho extremamente reduzido é considerado por muitos pesquisadores o determinante crítico da toxicidade dos NMs. Infelizmente, a variação de tamanho em diversos estudos se mistura com a composição química, carga de superfície, estrutura do ligante, impedindo uma conclusão exata de que o tamanho seria ou não associado com a toxicidade dos NMs. Além disso, GOODMAN *et al.* (2004) sugeriram que a toxicidade das NPs também pode variar de acordo com sua funcionalização, acrescentando também mais um fator, a “geometria” (diferentes formas de NPs) como mais um complicador de toxicidade, pois pode influenciar a trajetória da internalização celular dos NMs (FERRARI, 2005; GRATTON *et al.*, 2008).

Portanto, quando o tamanho das partículas excede as dimensões das macromoléculas biológicas, pode-se dizer que o NM atua como um “andaime” para atrair moléculas ou solução de complexos moleculares para si, mesmo sendo química e biologicamente inerte. Todavia, devido à sua ampla relação de superfície/volume, pode gerar complexos moleculares chamados “aglomerados” de NPs, com forte atividade biológica (PAN *et al.*, 2007; LUNDQVIST *et al.*, 2008).

1.7. Avaliação *IN VITRO*

Para avaliar a toxicidade de partículas, torna-se essencial a realização de estudos de toxicidade *in vitro*, pois estes auxiliam no direcionamento de experimentos *in vivo*.

No estudo com NPs com superfície modificada, inclusive de ouro, estas foram absorvidas por duas linhas de células (MLO-Y4 osteócito HeLa e células cancerosas do colo do útero) em várias concentrações, a translocação de NPs *in vitro* provavelmente ocorreu devido a processos como a difusão, canais transmembrânicos ou interações bioquímicas gerando alterações no tamanho destas células, que podem ser explicadas pelo potencial destas NPs em desenvolverem pequenas aberturas na membrana celular, permitindo uma troca mais significativa com o meio externo ou por causar uma resposta fisiológica pela localização intracelular dos NMs. Uma vez que as NPs penetram no citoplasma ou no núcleo, acredita-se que elas podem interagir fortemente com proteínas e várias estruturas de ácidos nucléicos dentro destes compartimentos, podendo aumentar ou limitar diversas funções celulares (MAHMOOD *et al.*, 2010). Estes pesquisadores acrescentaram ainda que, a endocitose de NMs pode desencadear a ligação de NPs a alvos intracelulares, o que poderia causar alterações da sinalização, da mobilidade e do metabolismo celular.

Embora vários estudos sugiram diferentes mecanismos de captação de NPs, acredita-se que a endocitose seria o mecanismo mais provável (GEISER *et al.*, 2005; ROTHENRUTISHAUSER *et al.*, 2006).

Estudando a toxicidade de AuNPs esféricas com 10 nm de tamanho cobertas com citrato em células dendríticas, o grupo de VILLIERS *et al.* (2010) relataram que estas NPs não foram tóxicas e não mudaram o fenótipo das células.

Vários trabalhos têm abordado a distribuição intracelular de AuNPs, mostrando que as AuNPs são capazes de entrar nas células e permanecerem presas em vesículas, mas não de entrar no núcleo (SHUKLA *et al.*, 2005; PERNODET *et al.*, 2006; CHITHRANI & CHAN, 2007; KHAN *et al.*, 2007; ALKILANY & MURPHY, 2010).

A maioria dos relatórios científicos investigou o impacto dos NMs sobre as células é *in vitro*, em comparação aos estudos *in vivo* (FISCHER & CHAN, 2007).

1.8. Avaliação *IN VIVO*

Um organismo como um todo é muito mais complexo do que uma única célula, portanto, mais estudos toxicológicos são essenciais para avaliar a segurança das NPs *in vivo*. Conforme os autores ALKILANY & MURPHY (2010), estes estudos devem incluir indicadores gerais de saúde, tais como: comportamento, perda de peso, percentual de mortalidade e longevidade do animal.

Enfatizado por POWERS *et al.* (2006) a dificuldade de caracterização de toxicidade *in vivo* é evidente, uma vez que os NMs são bastante complexos e os resultados conflitantes das pesquisas já realizadas levaram a diferentes conceitos sobre sua utilização e segurança, tornando complicado avaliar, generalizar e prever aspectos importantes de toxicidade.

Apesar dos estudos *in vitro* serem essenciais para nortear futuras pesquisas, modelos em animais é o sistema mais indicado para a avaliação toxicológica de um novo agente, e deve ser utilizado para caracterizar a possível toxicidade de AuNPs, pois as culturas *in vitro* não podem replicar a complexidade de um sistema *in vivo* ou fornecer dados significativos sobre a resposta de um sistema fisiológico a um agente (ZHANG, ROSS & ROEDER, 2010).

Os relatos disponíveis, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, diversificam amplamente em seus métodos, levando a conclusões contraditórias (OSTROWSKI *et al.*, 2009).

1.9. Tecido ósseo

O tecido ósseo, uma forma especializada de tecido conjuntivo, é o principal elemento do esqueleto. É composto por diferentes células e uma matriz extracelular calcificada, onde fibras de estabilização são incorporadas.

A composição óssea altera abruptamente com a idade, localização anatômica, estado nutricional e de saúde. No geral, a porcentagem mineral óssea é em torno de 50-70% da massa óssea no adulto e a matriz orgânica representa 20-40% de água e 5-10% de lipídios (SHEA & MILLER, 2005; WANG *et al.*, 2005).

Quatro tipos de células são responsáveis pela formação, reabsorção e manutenção dos ossos, sendo elas: osteoprogenitoras, osteoblastos, osteoclastos e osteócitos. As células osteoprogenitoras são derivadas do mesênquima embrionário e podem se diferenciar em

osteoblastos e células condrogênicas, localizam-se na camada celular interna do periósteo, revestindo os canais de Havers e o endósteo (SHEA & MILLER, 2005).

Os osteoblastos sintetizam a matriz óssea e participam da mineralização óssea, e suas funções são influenciadas por um número de mediadores endócrinos, como hormônio da paratireóide, prostaglandinas, estrógenos, vitamina D e citocinas. Por outro lado, os osteoclastos são células grandes, multinucleadas, responsáveis principalmente pela reabsorção óssea durante o processo de remodelação do tecido ósseo. Inúmeros fatores influenciam a regulação das funções dos osteoclastos e a reabsorção óssea, tais como, hormônio paratireóide (PTH), calcitonina, glicocorticóides, vitamina D, prolactina, interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral (TNF), prostaglandinas, interferon-gama e o fator de crescimento-beta e outros. Os osteócitos são células osteoblásticas maduras localizadas no interior da matriz óssea, e várias funções são atribuídas a estas células, sendo a manutenção da homeostase mineral a mais importante, permitindo a difusão de líquidos e minerais através do sistema canicular. Também atuam como sensor de estresses mecânicos responsáveis pelo início da reparação ou remodelação óssea (MARCUS, 1996; FERNANDEZ-TRESGUERRES-HERNANDEZ-GIL *et al.*, 2006).

Finalmente, as células de revestimento dos ossos são formadas pela inativação dos osteoblastos e de outras células do tipo mesenquimais que estão presentes principalmente nas superfícies ósseas do indivíduo na fase adulta. O papel destas células de revestimento inclui a divisão do compartimento de fluidos intersticiais a partir do osso, o suporte nutricional e metabólico dos osteócitos e o início da reabsorção óssea mediada pelos osteoclastos (MORI & BURR, 1993; BLAIR, 1998; COMPSTON, 2001; SHEA & MILLER, 2005).

Por meio de uma relação cooperativa entre os osteoblastos e osteoclastos, o tecido ósseo é constantemente remodelado em resposta aos requisitos fisiológicos (MARCUS, 1996). O processo de formação e remodelamento do tecido ósseo é influenciado por diversos fatores tais como hormonais, alimentação, genética, sexo, idade, doenças intercorrentes e fatores ambientais (DOREA & DONANGELO, 2006).

A matriz óssea é o principal constituinte do osso, sendo um material bem organizado, constituído de componente orgânico e inorgânico. Cerca de 90% da matriz orgânica do osso é composto de colágeno tipo I, que é sintetizado pelos osteoblastos e depositado em camadas distintas, conhecidas como lamelas nos ossos maduros. Este componente orgânico da matriz óssea confere ao osso sua forma externa e contribui para a sua capacidade de resistir à carga tensional. A matriz óssea também contém uma variedade de proteínas não colagenosas, que podem ser importante na organização da matriz, na mineralização do osso, bem como no

comportamento das células ósseas. Estas proteínas incluem: osteocalcina, osteonectina, fosfoproteínas e proteoglicanos (BUCKWALTER *et al.*, 1996; SHEA & MILLER, 2005).

A matriz inorgânica, ou fase mineral do osso, constitui cerca de 75% da massa do tecido ósseo e é composta principalmente de íons cálcio e fósforo, que são combinados para formar cristais extremamente pequenos, os cristais de hidroxiapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$, constituindo um reservatório de íons e conferindo ao osso rigidez e resistência (POSNER, 1985).

Aproximadamente 99% do cálcio do organismo, 85% do fósforo e 40% a 60% do total de sódio e magnésio estão associados aos cristais dos minerais ósseos (SHEA & MILLER, 2005).

Além das doenças crônicas ósseas (osteoporose, osteoartrite) associadas ao envelhecimento, o osso também é afetado por vários tipos de câncer originados de metástase de outros tecidos (90% dos pacientes que foram ao óbito devido a câncer de mama ou de próstata, tiveram metástases ósseas). O câncer e as metástases no osso são frequentemente associados à dor intensa e sua terapia é muito complicada, pela dificuldade da irradiação em atingir o tecido.

A incorporação de sistemas de entrega de drogas como agentes terapêuticos ósseos, poderia melhorar significativamente as chances de tratamento, aumentando a eficácia da segmentação óssea e reduzindo a toxicidade ou os efeitos secundários de novas drogas, alterando sua farmacocinética e biodistribuição, restringindo sua ação biológica ao sistema esquelético (WANG *et al.*, 2005).

O conhecimento da atuação das AuNPs sobre o tecido ósseo vem despertando grande interesse, pois são esperadas uma nova terapia para distúrbios ósseos como a osteoporose, estratégia de reconstrução óssea e um sistema avançado de diagnóstico por imagem de raio-x em 3D (ZHANG, ROSS & ROEDER, 2010).

Muitas funções dos ossos foram gradualmente sendo relatadas ao longo do tempo, não agindo apenas como um tecido de sustentação e locomoção do corpo, proteção de órgãos e reservatório de minerais, mas também como depósito de fatores de crescimento, ácidos graxos, metais pesados e outros elementos tóxicos (USKOKOVIC & USKOKOVIC, 2011).

Foram detectadas AuNPs com 40nm de diâmetro nos ossos de ratos 1 dia e 1 semana após uma única dose de 0,01 mg Au/kg MC (BALASUBRAMANIAN *et al.*, 2010).

Dentre os fatores ambientais influenciando o metabolismo ósseo, há relatos na literatura de possíveis atuações de AuNPs sobre o desenvolvimento e remodelamento ósseo.

Foram observadas por (SUL *et al.*, 2010) possíveis influências de AuNPs em células ósseas como redução da produção de espécies reativas (ROS) de oxigênio que poderia inibir a formação de osteoclastos induzida pela RANKL, causando uma *upregulation* da enzima antioxidante glutathione peroxidase (Gpx-1), gerando grandes perspectivas para as terapias de desordens ósseas.

Em contrapartida, existem relatos sobre as propriedades estruturais e morfológicas de alguns nanossistemas (nanopartículas de ouro e prata e nanotubos de carbono) que afetariam várias funções biológicas de osteoblastos humanos, como a indução de apoptose pela ativação da via da proteína caspase-3, gerando alterações morfológicas e funcionais dos osteócitos MLOY4 (MAHMOOD *et al.*, 2010).

1.10. Rim

Os rins exercem a função de filtração, secreção e reabsorção de água, sais e outras substâncias, formando a urina que é direcionada para a bexiga por meio dos ureteres e eliminada pela uretra para o exterior do organismo. Possuem uma cápsula fibrosa que protege o córtex, zona periférica, e a medula. Cada rim é formado de tecido conjuntivo que sustenta, nutre e define a forma do órgão, e de milhões de unidades filtradoras, os néfrons.

A função dos rins é remover os resíduos produzidos pelas células e outras substâncias. Além dessa função excretora, eles também são responsáveis pela osmorregulação, que se traduz pela eliminação de água e sais na urina. (GUYTON & HALL, 2002).

Em caso de intoxicação por substâncias químicas, vários tipos de lesões podem aparecer nas diferentes partes do sistema urinário tais como edema do túbulo proximal, degeneração e destruição nuclear de células renais, interferindo negativamente no mecanismo de defesa antioxidante, levando a um acúmulo de radicais livres, culminando em atrofia, necrose e morte celular (MAHMOOD *et al.*, 2010)

Um estudo de toxicidade em camundongos com AuNPs revestidas com polietileno-glicol (PEG) com diâmetros de 5, 10, 30, and 60 nm administradas via intraperitoneal com cerca de 200 uL de solução AuNPs numa dose de 4000 ug/Kg, indicou que as partículas de 10 e 60 nm causaram danos aos rins e fígado (ZHANG *et al.*, 2011).

Segundo CHOI *et al.* (2007), o tamanho e a química de superfície são fatores críticos na eliminação de NPs pelos rins. Estes autores relataram que AuNPs de 13, 5 nm de diâmetro revestidas com polietileno glicol (PEG) podem levar à toxicidade grave.

Foram injetadas em ratos AuNPs com 10, 50, 100, e 250 nm de tamanho e 24 horas após o tratamento quantificaram a concentração de AuNPs em diversos órgãos, mostrando que AuNPs menores (10nm) foram encontradas em quase todos os órgãos estudados. Contudo, as AuNPs maiores foram encontradas somente no baço e rim (DE JONG *et al.*, 2008).

Os autores LONGMIRE, CHOYKE & KOBAYASHI (2008) concluíram que a concentração de AuNPs no rim é dependente do tempo (pós tratamento), e a acumulação destas com 12,5 nm de tamanho poderia ser pela diferença de diâmetro entre estas as NPs os poros glomerulares que são menores, medindo cerca de 5,5 nm, tonando assim, improvável a passagem das NPs pela filtração glomerular.

1.11. Fígado

O fígado é um órgão chave na fisiologia, recebendo aproximadamente 25% do débito cardíaco total, o que lhe permite realizar numerosas funções vitais, essenciais à manutenção da homeostasia do organismo. Estrategicamente situado no sistema circulatório recebe suprimento sanguíneo duplo: cerca de 20% do seu fluxo é rico em O₂ proveniente da artéria hepática, enquanto o restante 80% é rico em nutrientes e provêm da veia porta. Isto permite ao fígado controlar as substâncias absorvidas em todo o intestino e determinar quais vão entrar, e como vão entrar na circulação sistêmica.

Este órgão está sujeito a uma variedade de agentes agressores, metabolizando compostos exógenos (fármacos e toxinas), inativando-os e excretando-os. Destaca-se também pela regulação do metabolismo de diversos nutrientes, papel imunológico, síntese protéica e de outras moléculas, armazenamento de vitaminas e ferro, e degradação hormonal.

As células mais importantes do fígado são os hepatócitos, constituindo cerca de 2/3 da sua massa. Além dos hepatócitos, das células endoteliais fenestradas e dos componentes biliares, existem outros tipos de células consideradas fundamentais no fígado, as células de Kupffer (KCS). Estas células, junto com as células endoteliais, recobrem as placas hepatocelulares e são capazes de fagocitar substâncias estranhas presentes no sangue dos seios hepáticos. São envoltas por fibras reticulares que por serem descontínuas, permitem a passagem do plasma aos hepatócitos. Além disso, as KCS estão diretamente ligadas a certas patogênias e são as primeiras a entrar em contato com bactérias, endotoxinas e restos microbianos derivados do trato gastrointestinal (GUYTON & HALL, 2002).

Um aumento do número de KCS foi observado no fígado de camundongos tratados com AuNPs. A ativação destas células indicam potencial tóxico causado por AuNPs e a hiperplasia produzida poderia ser correlacionada ao mecanismo de defesa e de desintoxicação (NEYRINCK, 2004).

Avaliou-se a biodistribuição de AuNPs 20 nm de diâmetro, cobertas com diferentes superfícies, incluindo citrato, após administração via intravenosa (*i.v*) em ratos (0,6-1mg Au / kg). As AuNPs revestidas com citrato (AuNPs+citrato) foram rapidamente removidas da circulação com 60% da dose injetada acumulada no fígado. Após 24 h, o fígado, apresentou um maior nível de AuNPs, demonstrando que as AuNPs são rapidamente distribuídas e que o fígado é o órgão preferencial de depósito (MORAIS *et al.*, 2012).

Em um estudo de biodistribuição e mudanças da expressão gênica no fígado e baço de ratos após dose única via (*i.v*) de AuNPs+Citrato com 40 nm de diâmetro na dose (0,01 mg Au/kg MC) com volume de 0,2 mL, os autores BALASUBRAMANIAN *et al.* (2010) observaram que altos níveis destas NPs permaneceram relativamente constante durante 24 horas no fígado dos animais, indicando uma eliminação ineficaz, descrito também por outros autores mesmo a longo prazo (até 6 meses) (PACIOTTI *et al.*, 2004; BERGEN *et al.*, 2006; DE JONG *et al.*, 2008).

Outro estudo de biodistribuição, também relata a presença de AuNPs distribuídas no cólon, pulmão, medula óssea, fígado, baço e vasos linfáticos após injeção intravenosa (HAGENS *et al.*, 2007).

Estudando o potencial de toxicidade em com AuNPs revestidas com PEG com diâmetros de 5, 10, 30, and 60 nm em camundongos, administradas via intraperitoneal com cerca de 200 µL de solução AuNPs numa dose de 4000 µg /Kg , foram observados como órgãos-alvo dominantes de acúmulo de NPs o baço e o fígado. Os resultados mostraram que as AuNPs com os tamanhos de 5 nm e 10 nm acumularam-se principalmente no fígado (ZHANG *et al.*, 2011).

1.12. Coração

O coração é uma bomba propulsora de sangue dividido em quatro cavidades, composta de dois átrios e dois ventrículos, sendo capaz de distribuir o sangue para o pulmão (circulação pulmonar) e para os demais órgãos do corpo (circulação sistêmica).

O fluxo de sangue que é ejetado do coração durante a sístole ventricular (momento em que o músculo cardíaco contrai), acontece de forma intermitente de acordo com os eventos conhecido como ciclo cardíaco. Este fluxo é suficiente para nutrir os sistemas corporais em condições de repouso, sendo necessário que o sangue passe por um circuito de tubos denominados de vasos sanguíneos (GUYTON & HALL, 2002).

Em um estudo de biodistribuição através de repetidas administrações de AuNPs com tamanhos variados (58, 28, 10 e 4 nm) via oral e tratamento agudo (4 dias) detectaram AuNPs no coração, mas em menores quantidades quando comparado com o fígado e baço (HILLYER & ALBRECHT, 2001).

Outros estudos similares, também observaram a presença de AuNPs no coração mesmo em quantidades inferiores em relação a outros órgãos (OBERDORSTER, OBERDORSTER & OBERDORSTER, 2005; LASAGNA-REEVES *et al.*, 2010).

2. OBJETIVOS

Devido aos poucos estudos *in vivo* sobre comportamento de AuNPs no tecido ósseo, as promessas de seu uso no combate às desordens ósseas e a existência de relatos sobre o potencial tóxico das AuNPs sobre importantes órgãos como, rim, fígado e coração, o objetivo deste estudo foi analisar possíveis influências da exposição de AuNPs sobre o tecido ósseo, rim, fígado e coração. Assim, após uma única exposição intravenosa, foram analisados parâmetros biométricos, biofísicos e biomecânicos ósseos e o peso úmido dos órgãos supracitados de ratos adultos nos períodos pós-tratamento de uma semana, um mês e dois meses.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais e Condições Experimentais

Utilizou-se neste experimento, 106 ratos intactos da linhagem “Wistar”, com quatro meses de idade (média de massa corporal inicial de ± 393 g), provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (entre 7 a 10 por caixa) e permaneceram no Biotério do Laboratório de Neuroendócrinologia desta universidade sob regime de luz (10 horas claro e 14 horas escuro) e temperatura controlados ($22^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$), com ração comercial e água “*ad libitum*”.

O experimento foi conduzido de acordo com os princípios internacionais de ética na experimentação animal (NATIONAL RESEARCH COUNCIL (US) BOARD ON BIOLOGY, 1998) e todo esforço foi feito para minimizar o desconforto dos animais durante o estudo. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFSCar, protocolo CEEA nº 078/2010.

3.2. Grupos Experimentais

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos (uma semana, um mês e dois meses), subdivididos em quatro, os quais foram tratados respectivamente com polímero poliaminoamida (PAMAM), AuNPs+PAMAM, Citrato (tampão citrato) e Citrato + AuNPs. Conforme ilustrado na figura 4.

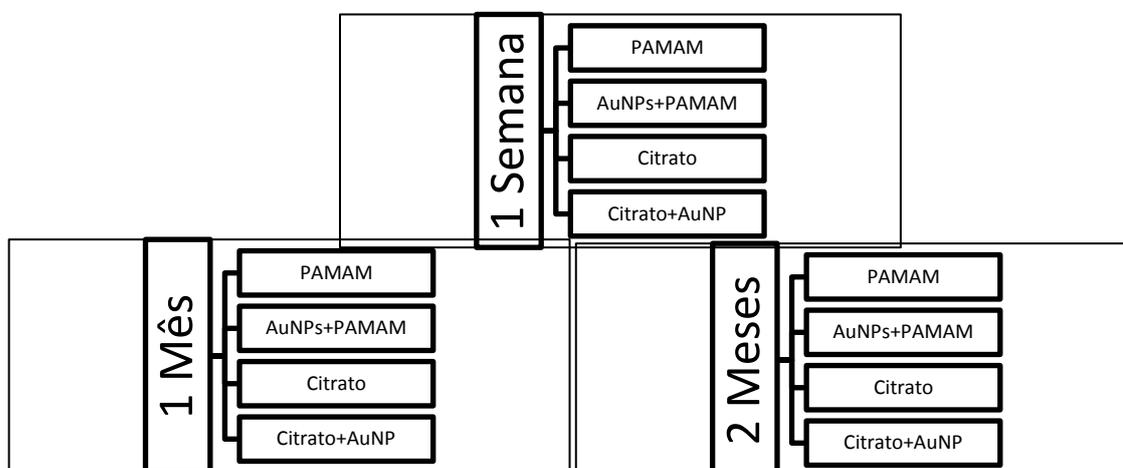


Figura 4- Distribuição dos animais (1 semana, 1 mês e 2 meses).

As nanopartículas de ouro com (15,1 mg/mL) de concentração foram administradas em uma única dose (0,01 mg Au/kg MC) no volume de de 0,4 mL, via veia jugular.



Figura 5- Tratamento com injeção intravenosa (*i.v*) via veia jugular.

Os animais foram eutanasiados após uma semana (37 animais), um mês (35 animais) e dois meses (34 animais) após o tratamento. Foram pesados no início (antes do tratamento) e no final (antes da eutanásia) do experimento para acompanhamento do desenvolvimento dos mesmos.

A injeção de 0,4 mL de volume na dose de 0,01 mg Au/kg MC de AuNPs foi determinada baseado no estudo de (BALASUBRAMANIAN *et al.*, 2010), que calcularam a dose de AuNPs necessária para percorrer todo o sistema circulatório do rato, de acordo com sua massa corporal, após uma injeção (*i.v*), simulando uma exposição ambiental e não acidental de AuNPs.

Para realizar as injeções *i.v*, as soluções foram agitadas em um sonicador da marca Sonics & Materials Inc. Danbury, Connecticut U.S.A. por 5 minutos.

3.3. Coleta do tecido ósseo

Após a eutanásia, o fêmur direito foi coletado, dissecado e imediatamente armazenado em solução salina 0,9% a -20 °C.

3.3.1. Coleta dos órgãos

O rim, fígado e coração dos animais foram extraídos e imediatamente pesados.

3.4.Preparo de AuNPs

As AuNPs estabilizadas pelo dendrímero PAMAM-G4 foram fornecidas pelo Laboratório de Nanomedicina e Nanotoxicologia, Instituto de Física de São Carlos (IFSC) da Universidade de São Paulo –USP. Dendrímeros PAMAM são macromoléculas hidrofílicas de PAMAM altamente ramificadas e funcionalizadas com grupos NH_2 na superfície. As cavidades desta molécula são usadas para o controle do tamanho e estabilização de NPs. Brevemente, a síntese das AuNP-PAMAM consistiu na adição de 5 mL de HAuCl_4 1,0 mmol L^{-1} a uma solução de PAMAM 0,07 mmol L^{-1} G4 e, finalmente, 5 mL de ácido fórmico (10% v/v) sob agitação e protegido da luz. Após um período total de 4 horas, a coloração do sistema passou de amarelo claro para vermelho, indicando que o complexo zero valente foi formado (CRESPILHO *et al.*, 2008).

As AuNPs-citrato foram obtidas por redução do sal de ouro pelo citrato, como descrito por (TURKEVITCH *et al.*, 1951). De forma sucinta, 14 mL de 0,05 mol L^{-1} de HAuCl foram aquecidas com vigorosa agitação. Em seguida, 1 mL de citrato de sódio a 1% foi adicionado. Este sistema foi mantido sob agitação e temperatura de ebulição em um sistema de refluxo até que a cor da solução mudasse de amarelo claro para vermelho, e então a suspensão foi gradualmente resfriada à temperatura ambiente.

O excesso de PAMAM e citrato foram removidos após sucessivas etapas de centrifugações e lavagem, utilizando tampão fosfato 0,05 M pH 7,0. O tamanho e a morfologia das nanopartículas foram caracterizados por Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) (CM120 Bio Twin, FEI–Philips, Hillsbro, USA). Em ambos os casos, as amostras foram preparadas depositando uma gota da suspensão de AuNPs sobre uma grade de cobre recoberta por um filme fino de carbono 300 mesh (Ted Pella, Inc.), a água foi lentamente evaporada a temperatura ambiente. As imagens mostraram a obtenção de nanopartículas esféricas e com diâmetro médio de $6,1 \pm 0,2$ nm e $18,2 \pm 0,4$ nm, para as AuNPs estabilizadas em PAMAM e citrato, respectivamente.

A figura 6 mostra o espectro de absorção das AuNPs-PAMAM G4. A banda em aproximadamente 525 nm é típica de nanopartículas de ouro e é devida a oscilação coletiva dos elétrons livres, sendo chamada de banda de ressonância plasmônica.

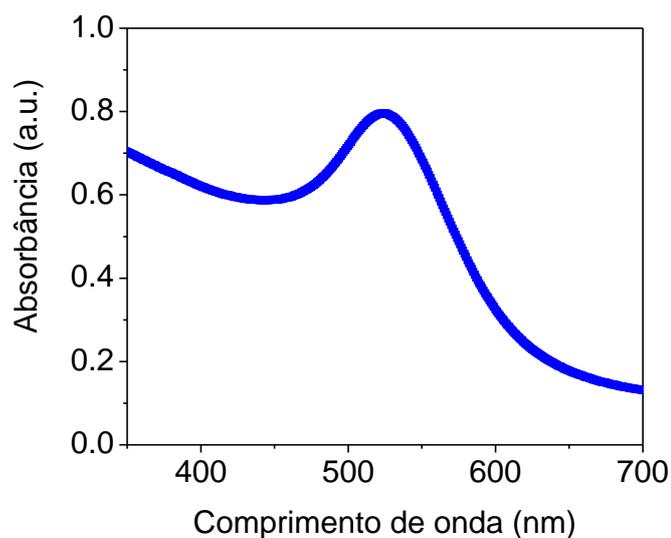


Figura 6- Espectro de absorção das AuNPs-PAMAM.

3.5. Protocolo de Análises

3.5.1. Medidas do comprimento do fêmur direito

Estas mensurações foram realizadas com um paquímetro (precisão de 0,05 mm) seguindo a padronização referencial: região distal dos côndilos femorais (face articular com a tibia) e saliência óssea mais proximal do trocânter maior.

3.5.2. Medidas das espessuras das diáfises femorais

Foram mensurados com o paquímetro, os diâmetros maiores (realizado na posição látero-lateral) e menores (realizado na posição ântero-posterior) da diáfise femoral, seguindo a padronização referencial: base do terceiro trocânter.

3.5.3. Parâmetros Biomecânicos

Por meio do teste de flexão a três pontos, as propriedades biomecânicas dos fêmures direitos foram mensuradas utilizando-se a máquina de ensaio universal INSTRON modelo 4444 (Figura 1), cuja célula de carga apresenta capacidade máxima de 100 kgf

(aproximadamente 1 kN). As extremidades dos fêmures ficaram apoiadas em dois roletes com diâmetro de 3 mm, distanciados em 21,70 mm e a região central (das diáfises) dos ossos foi selecionada para a aplicação da carga (ROBLING & TURNER, 2002; SHIMANO, SHIMANO & VOLPON, 2002; AKHTER *et al.*, 2003).

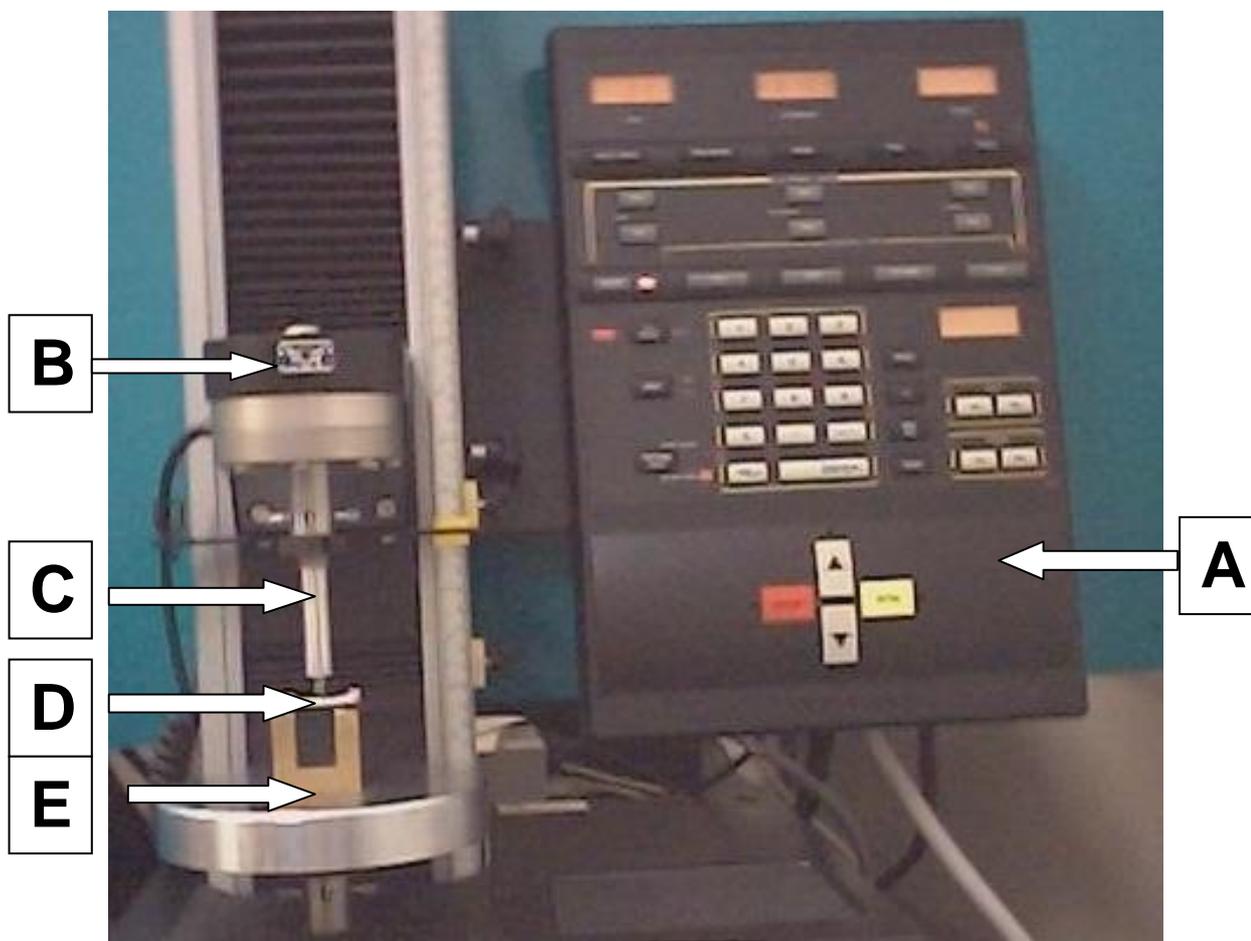


Figura 7- Máquina de Ensaio Universal Instron (modelo 4444) utilizada para o ensaio de flexão a três pontos em fêmures de ratos. **A:** painel de controle; **B:** célula de carga ligada à ponte de extensimetria (1 kN); **C:** haste cilíndrica para a aplicação de carga (força); **D:** osso (fêmur de rato); **E:** suporte.

Doze horas antes do início do ensaio, os ossos foram descongelados à temperatura ambiente e mantidos em solução salina até o momento antecedente ao teste (ENGESAETER, EKELAND & LANGELAND, 1978; PENG *et al.*, 1994).

No início do teste, aplicou-se uma pré-carga de 5 N por meio de uma haste cilíndrica com um rolete de 3 mm em sua extremidade, no sentido pósterio-anterior e perpendicular ao eixo longitudinal para acomodação da amostra (estabilização do fêmur). Houve a

padronização do tempo de acomodação em um minuto para todas as amostras e após este período, aplicou-se uma força no mesmo sentido, com velocidade constante de 0,5 cm/min, até o momento da ruptura do osso.

Os resultados dos ensaios foram registrados pelo software Instron Series IX na forma gráfica, gerando uma curva: carga x deformação (Figura 2). Da análise das curvas obtiveram-se as seguintes propriedades biomecânicas: carga (força) máxima, resiliência, e rigidez.

3.5.3.1. Carga Máxima (N)

Corresponde a maior carga suportada pela amostra (fêmur) durante o ensaio (C_2 , na figura 8).

3.5.3.2. Resiliência (J)

Corresponde à área sob a curva carga x deformação até o limite elástico. Representa a energia absorvida pelo tecido ósseo durante a fase elástica, ou seja, o impacto que a amostra suporta sem deformar-se permanentemente.

3.5.3.3. Rigidez (N/mm)

Determinada por meio da inclinação da reta (T) ajustada aos pontos da curva carga x deformação na fase elástica (SOGAARD *et al.*, 1997). Representa a capacidade de resistir a deformações.

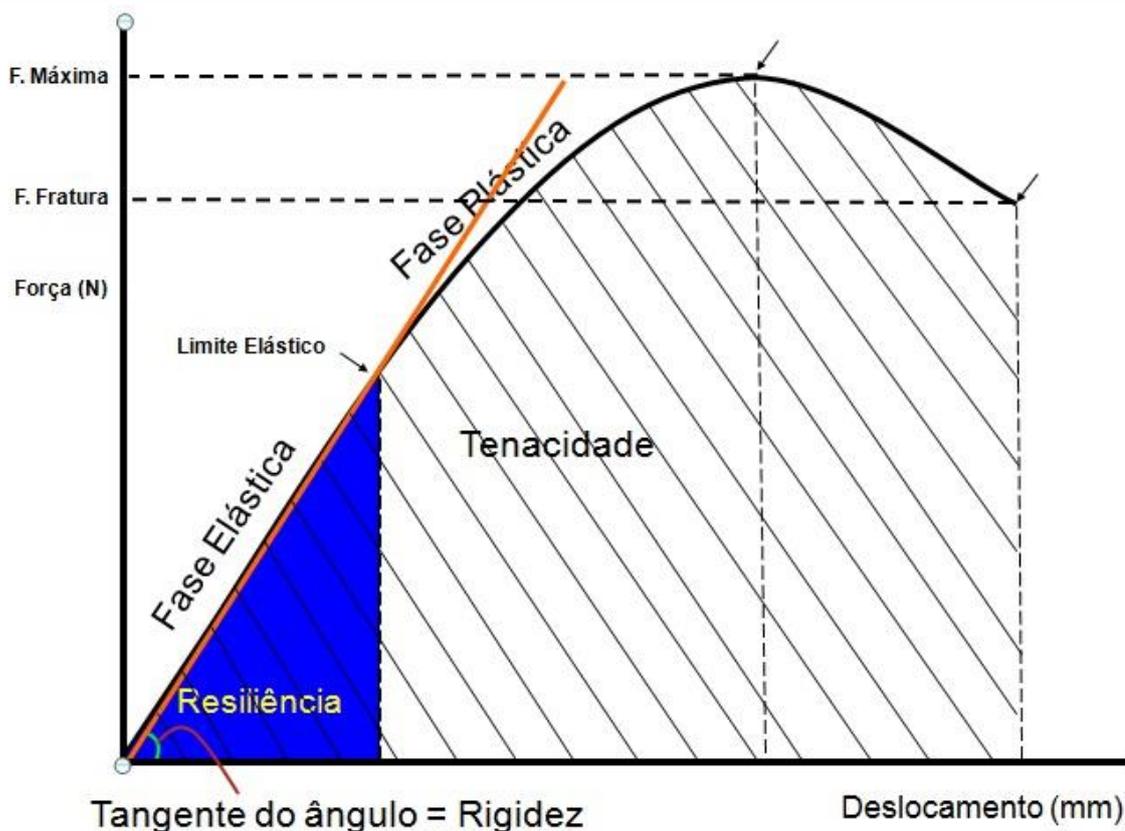


Figura 8: Gráfica Carga x Deformação utilizada para determinação das propriedades biomecânicas: C_2 : Carga Máxima; C_3 : a área desta região corresponde a Resiliência; T: tangente da região O/ C_1 da curva, sendo o ângulo desta correspondente a Rigidez.

3.5.4. Parâmetros Físicos

Após a verificação dos parâmetros biométricos dos fêmures dos animais (grupos controle e tratados), os ossos foram mantidos (imersos em água destilada) em um dessecador por um período de 24 horas objetivando a retirada do ar presente nos poros ósseos. Em seguida obteve-se os pesos imerso (P_i) e úmido (P_u). Esses dados foram coletados antes do ensaio biomecânico e, após o mesmo, as amostras ficaram armazenadas em uma estufa na temperatura de 100°C durante 24 horas com o intuito de desidratação e, posteriormente, a coleta do peso seco (P_s). Para obtenção do peso das cinzas (material mineral - P_m), os ossos foram mantidos em uma mufla na temperatura de 800°C por um período de 24 horas (NORDSLETTEN *et al.*, 1994). Todas as medidas citadas foram obtidas por meio de uma balança eletrônica (marca Chyo).

Baseando-se no Princípio de Arquimedes, foi calculado o volume ósseo e subsequentemente densidade óssea e mineral, percentuais ósseos de água, material orgânico e material mineral, por meio das fórmulas citadas abaixo (MARTIN, 1990):

$$\text{Volume ósseo} = \frac{P_u - P_i}{\rho} \text{ (cm}^3\text{)}$$

$$\text{Densidade óssea} = \frac{P_u}{\text{Volume Ósseo}} \text{ (g/cm}^3\text{)}$$

$$\text{Densidade mineral} = \frac{P_m}{\text{Volume ósseo}} \text{ (g/cm}^3\text{)}$$

$$\text{Percentual Ósseo de Água} = \frac{100 \times (P_u - P_s)}{P_u}$$

$$\text{Percentual Material Orgânico} = \frac{100 \times (P_s - P_m)}{P_u}$$

$$\text{Percentual Material Mineral} = \frac{100 \times P_m}{P_u}$$

Onde:

P_u = peso úmido ósseo

P_s = peso ósseo da amostra desidratada

P_i = peso imerso ósseo

P_m = peso do material mineral (cinzas)

ρ = densidade da água

3.6.Peso dos Órgãos

Após a eutanásia dos animais, as massas do rim, fígado e coração foram obtidas imediatamente após sua extração (em gramas) por meio de uma balança eletrônica (marca Chyo).

4. Análise Estatística

Os dados obtidos em cada grupo (média \pm desvio padrão) foram comparados entre si por meio do teste paramétrico One Way Anova e o teste de comparações múltiplas Bonferroni. Toda análise foi realizada por meio do software GraphPad Prism[®] adotando-se um nível de significância menor que 5% ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS

5.1. Massa Corporal

Na tabela 1, observa-se os valores da massa corporal inicial (antes do tratamento) e final (antes da eutanásia) dos animais dos grupos PAMAM, PAMAM+AuNPs, Citrato e Citrato+AuNPs, uma semana, um mês e dois meses após a administração das nanopartículas. Apesar das diferenças nos tamanhos das NPs, não houve diferença significativa entre os grupos nos diferentes períodos.

Tabela 1: Massa corporal (g) Inicial (Ini) e Final (Fin) dos animais dos grupos PAMAM, AuNPs+PAMAM, Citrato e AuNPs+Citrato eutanasiados uma semana, um mês e dois meses após injeção de AuNPs.

Grupos	Parâmetro	PAMAM	AuNPs+PAMAM	Citrato	AuNPs+Citrato
1 SEMANA	Massa (Ini)	391,25 ± 9,34(8)	392,57 ± 9,59(8)	398,22 ± 8,33(9)	396,00 ± 8,00(9)
	Massa (Fin)	405,75 ± 8,71(8)	405,50 ± 8,26(8)	410,22 ± 7,77(9)	408,22 ± 8,45(9)
1 MÊS	Massa (Ini)	385,77 ± 9,66(9)	390,00 ± 8,79(10)	397,75 ± 8,73(8)	396,20 ± 8,24(10)
	Massa (Fin)	419,78 ± 12,27(9)	423,50 ± 11,33(10)	432,25 ± 14,79(8)	430,30 ± 14,61(10)
2 MESES	Massa (Ini)	394,29 ± 15,81(7)	393,25 ± 14,66(8)	397,56 ± 12,52(9)	397,00 ± 14,73(10)
	Massa (Fin)	458,86 ± 36,75(7)	421,75 ± 27,37(8)	429,56 ± 36,75(9)	417,60 ± 22,68(10)

Média ± Desvio Padrão; () = n° de animais

Os valores das massas inicial e final dos animais dos grupos PAMAM, PAMAM+AuNPs, Citrato e Citrato+AuNPs, uma semana, um mês e dois meses após a administração das NPs podem ser observados nas figuras 9, 10 e 11. Não houve diferenças significativas entre os grupos nos diferentes períodos.

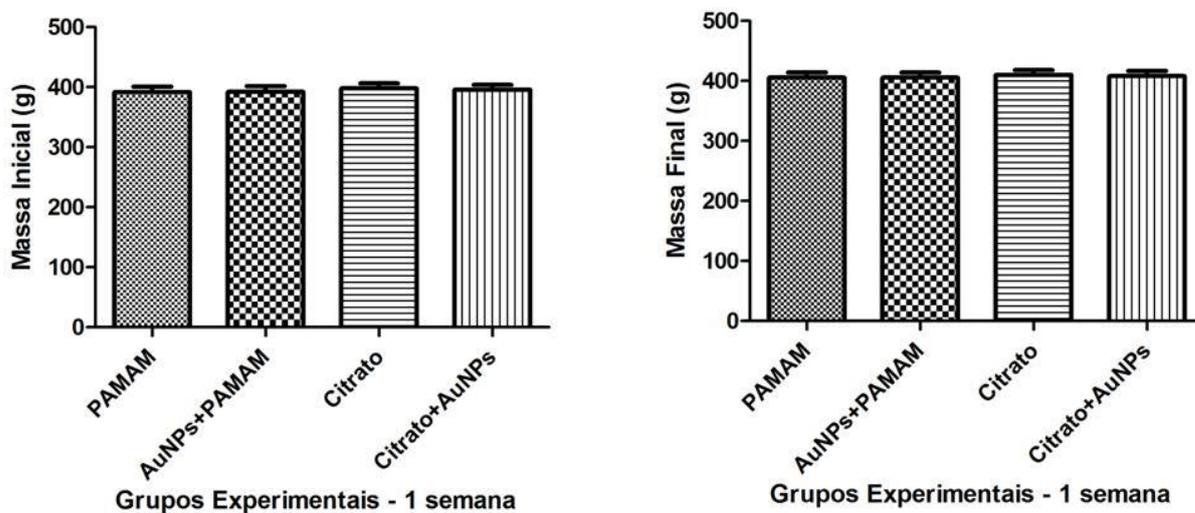


Figura 9 - Representação Esquemática dos valores de massa corporal inicial e final dos animais após uma semana de tratamento dos diferentes grupos experimentais. O teste paramétrico One Way Anova não detectou diferenças significativas entre os grupos para $p < 0,05$.

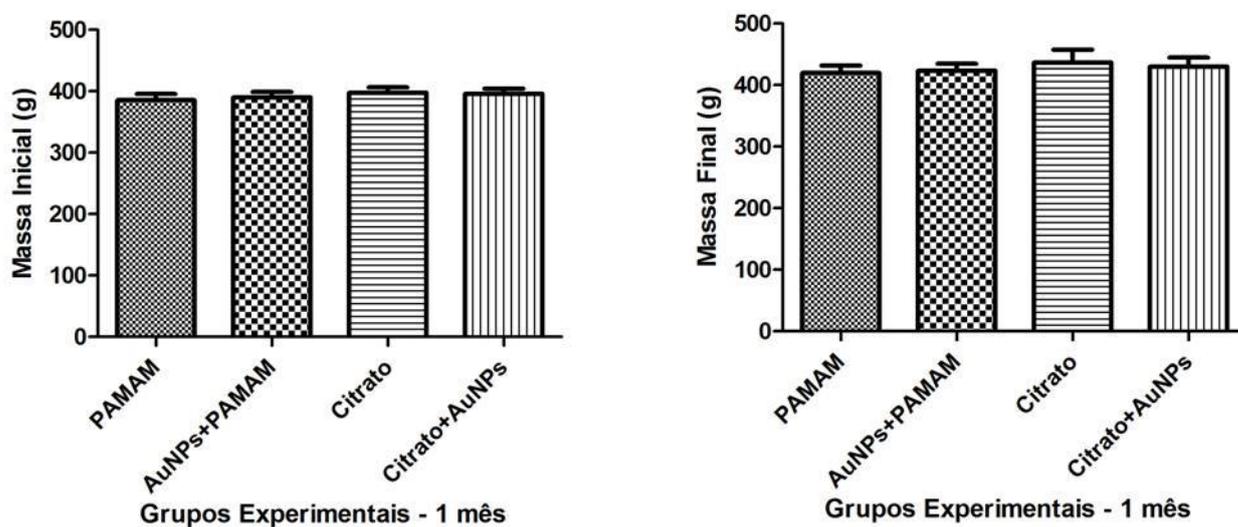


Figura 10 - Representação Esquemática dos valores de massa corporal inicial e final dos animais após um mês de tratamento dos diferentes grupos experimentais. O teste paramétrico One Way Anova não detectou diferenças significativas entre os grupos para $p < 0,05$.

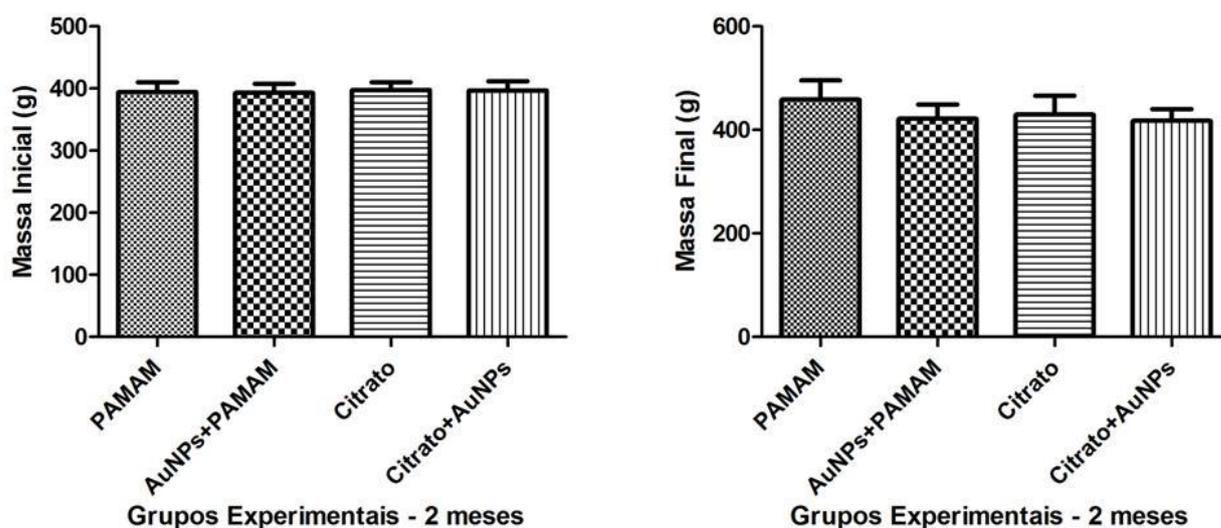


Figura 11 - Representação Esquemática dos valores de massa corporal inicial e final dos animais após dois meses de tratamento dos diferentes grupos experimentais. O teste paramétrico One Way Anova não detectou diferenças significativas entre os grupos para $p < 0,05$.

5.2. Parâmetros Biométricos, Biofísicos e Biomecânicos

Pode-se observar nas tabelas 2, 3, 4 as medidas do comprimento, diâmetro maior e menor da diáfise femural e os valores do volume ósseo, densidade óssea e mineral, Força Máxima, Resiliência e Rigidez dos fêmures direito dos animais de cada grupo: PAMAM, AuNPs+PAMAM, Citrato e AuNPs+Citrato nos tempos de uma semana, um mês e dois meses. Apesar das diferenças nos tamanhos das NPs, não houve diferenças significativas dos diferentes parâmetros entre os grupos nos seus respectivos períodos de tratamento.

Tabela 2: Parâmetros Biométricos, Biofísicos e Biomecânicos dos fêmures dos animais dos grupos PAMAM, AuNPs+PAMAM, Citrato e AuNPs+Citrato, eutanasiados uma semana após a injeção de AuNPs.

Grupos	Parâmetros	PAMAM	AuNPs+PAMAM	Citrato	AuNPs+Citrato
Biométricos	Comp. (mm)	3,92 ± 0,06 (8)	3,93 ± 0,03 (8)	3,96 ± 0,06 (9)	3,99 ± 0,03 (9)
	Ø Maior (mm)	0,59 ± 0,06 (8)	0,60 ± 0,06 (8)	0,60 ± 0,01 (9)	0,60 ± 0,01 (9)
	Ø Menor (mm)	0,31 ± 0,02 (8)	0,32 ± 0,03 (8)	0,32 ± 0,09 (9)	0,32 ± 0,06 (9)
Biofísicos	Volume (cm ³)	0,62 ± 0,03 (8)	0,66 ± 0,03 (8)	0,62 ± 0,03 (9)	0,63 ± 0,03 (9)
	D.Óssea (g/cm ³)	1,55 ± 0,03 (8)	1,56 ± 0,05 (8)	1,57 ± 0,01 (9)	1,57 ± 0,02 (9)
	D.Mineral (g/cm ³)	0,65 ± 0,04 (8)	0,65 ± 0,06 (8)	0,62 ± 0,04 (9)	0,61 ± 0,04 (9)
Biomecânicos	Força Máx. (N)	118,4± 8,5(8)	117,9 ± 9,9 (8)	108,5 ± 13,7 (9)	105,5 ± 10,4 (9)
	Resiliência (J)	0,054± 0,013 (8)	0,057 ± 0,017 (8)	0,048 ± 0,012 (9)	0,049 ± 0,06(9)
	Rigidez (N/mm)	239,34 ± 10,26 (8)	238,80 ± 9,48 (8)	229,02 ± 11,96 (9)	226,20 ± 17,25(9)

Comp = comprimento, Ø = diâmetro, D= densidade, Média ± Desvio Padrão; () = n° de animais

Tabela 3: Parâmetros Biométricos, Biofísicos e Biomecânicos dos fêmures dos animais dos grupos PAMAM, AuNPs+PAMAM, Citrato e AuNPs+Citrato, eutanasiados um mês após a injeção de AuNPs.

Grupos	Parâmetros	PAMAM	AuNPs+PAMA M	Citrato	AuNPs+Citrato
Biométricos	Comp.(mm)	4,03 ± 0,03 (9)	4,05 ± 0,06 (10)	4,04 ± 0,06 (8)	4,05 ± 0,06 (10)
	Ø Maior(mm)	0,62 ± 0,02 (9)	0,62 ± 0,02 (10)	0,63 ± 0,02 (8)	0,64 ± 0,01 (10)
	Ø Menor(mm)	0,33 ± 0,01 (9)	0,34 ± 0,01 (10)	0,34 ± 0,05 (8)	0,34 ± 0,01 (10)
Biofísicos	Volume (cm ³)	0,64 ± 0,05 (9)	0,67 ± 0,03 (10)	0,68 ± 0,03 (8)	0,69 ± 0,06 (10)
	D. Óssea (g/cm ³)	1,59 ± 0,07 (9)	1,56 ± 0,02 (10)	1,57 ± 0,02 (8)	1,56 ± 0,06 (10)
	D. Mineral (g/cm ³)	0,67 ± 0,05 (9)	0,67 ± 0,04 (10)	0,69 ± 0,03 (8)	0,65 ± 0,03 (10)
Biomecânicos	Força Máx. (N)	129,6 ± 9,50 (9)	134,22 ± 16,22 (10)	141,80 ± 7,9 (8)	138,56 ± 18,88 (10)
	Resiliência (J)	0,062 ± 0,014 (9)	0,076 ± 0,017 (10)	0,078 ± 0,014 (8)	0,068 ± 0,022 (10)
	Rigidez (N/mm)	272,20 ± 21,64 (9)	279,76 ± 69,61 (10)	306,00 ± 42,46 (8)	300,75 ± 25,39 (10)

Comp = comprimento, Ø = diâmetro, D= densidade, Média ± Desvio Padrão; () = n° de animais

Tabela 4: Parâmetros Biométricos, Biofísicos e Biomecânicos dos fêmures dos animais dos grupos PAMAM, AuNPs+PAMAM, Citrato e AuNPs+Citrato, eutanasiados dois meses após a injeção de AuNPs.

Grupo	Parâmetro	PAMAM	AuNPs+PAMAM	Citrato	AuNPs+Citrato
Biométricos	Comp.(mm)	4,01 ± 0,12 (7)	4,00 ± 0,08 (8)	4,07 ± 0,06 (9)	4,04 ± 0,06 (10)
	Ø Maior (mm)	0,49 ± 0,03 (7)	0,48 ± 0,02 (8)	0,49 ± 0,03 (9)	0,49 ± 0,02 (10)
	Ø Menor (mm)	0,36 ± 0,01 (7)	0,35 ± 0,01 (8)	0,35 ± 0,02 (9)	0,36 ± 0,02 (10)
Biofísicos	Volume (cm ³)	0,73 ± 0,05 (7)	0,72 ± 0,03 (8)	0,73 ± 0,05 (9)	0,71 ± 0,05 (10)
	D. Óssea (g/cm ³)	1,54 ± 0,02 (7)	1,55 ± 0,04 (8)	1,54 ± 0,02 (9)	1,55 ± 0,04 (10)
	D. Mineral (g/cm ³)	0,66 ± 0,03 (7)	0,66 ± 0,04 (8)	0,65 ± 0,03 (9)	0,66 ± 0,03 (10)
Biomecânicos	Força Máx. (N)	161,69 ± 16,75 (7)	150,68 ± 10,52 (8)	152,06 ± 19,77 (9)	148,08 ± 9,45 (10)
	Resiliência (J)	0,083 ± 0,024 (7)	0,069 ± 0,030 (8)	0,071 ± 0,016 (9)	0,78 ± 0,19 (10)
	Rigidez (N/mm)	341,63 ± 29,55 (7)	323,59 ± 34,95 (8)	341,94 ± 48,93 (9)	347,85 ± 33,75(10)

Comp = comprimento, Ø = diâmetro, D= densidade, Média ± Desvio Padrão; () = n° de animais

Os valores dos parâmetros biométricos, biofísicos e biomecânicos dos animais dos grupos PAMAM, PAMAM+AuNPs, Citrato e Citrato+AuNPs, uma semana, um mês e dois meses após a administração das NPs podem ser observados nas figuras 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 e 20. Não houve diferenças significativas entre os grupos nos diferentes períodos.

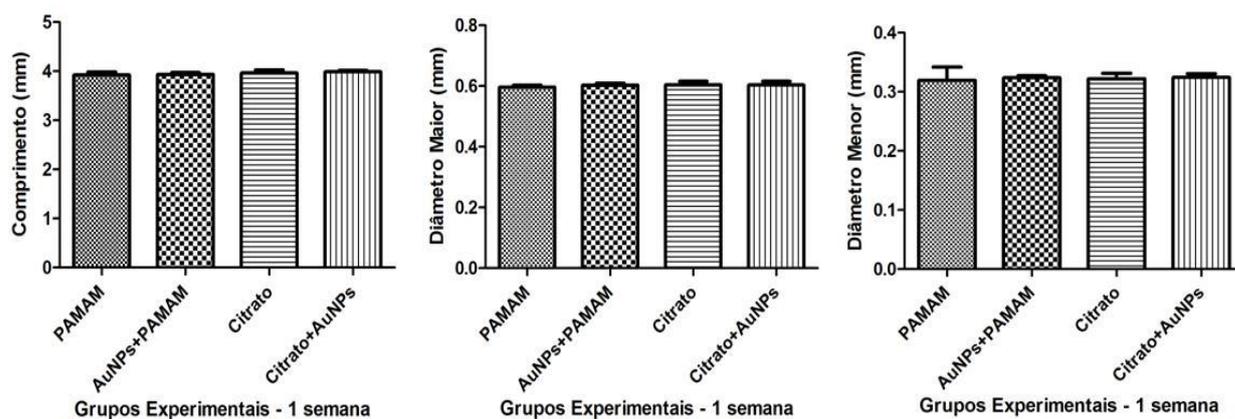


Figura 12 - Representação Esquemática dos valores de parâmetros biométricos dos fêmures dos animais após uma semana de tratamento dos diferentes grupos experimentais. O teste paramétrico One Way Anova não detectou diferenças significativas entre os grupos para $p < 0,05$.

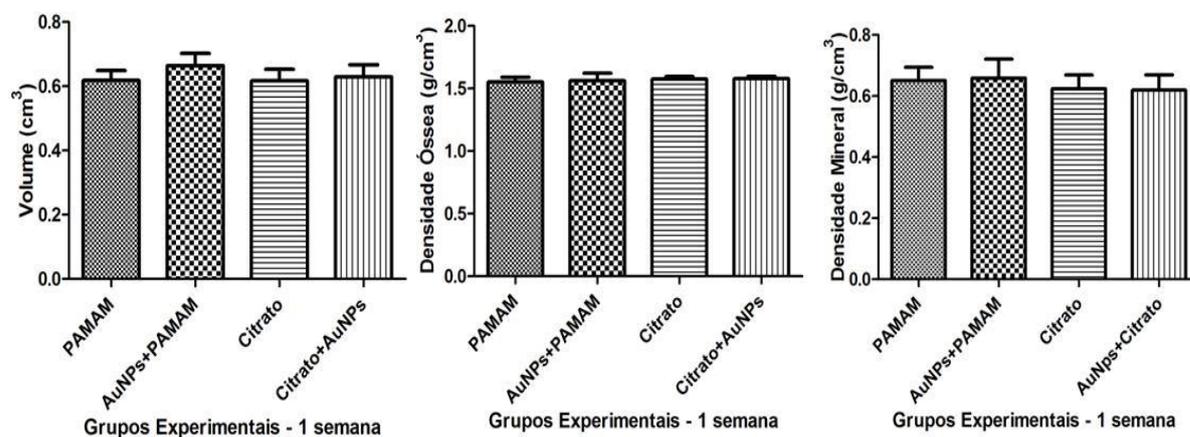


Figura 13 - Representação Esquemática dos valores de parâmetros biofísicos dos fêmures dos animais após uma semana de tratamento dos diferentes grupos experimentais. O teste paramétrico One Way Anova não detectou diferenças significativas entre os grupos para $p < 0,05$.

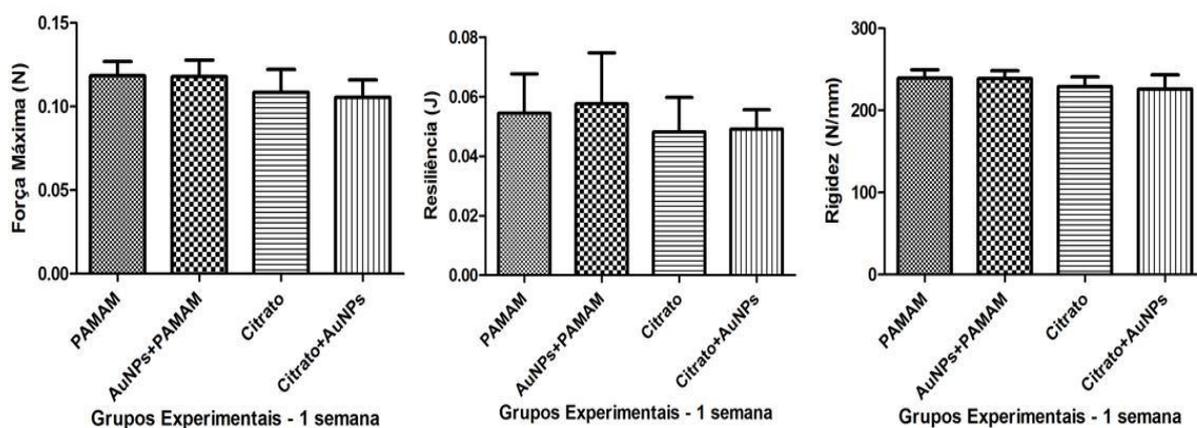


Figura 14 - Representação Esquemática dos valores de parâmetros biomecânicos dos fêmures dos animais após uma semana de tratamento dos diferentes grupos experimentais. O teste paramétrico One Way Anova não detectou diferenças significativas entre os grupos para $p < 0,05$.

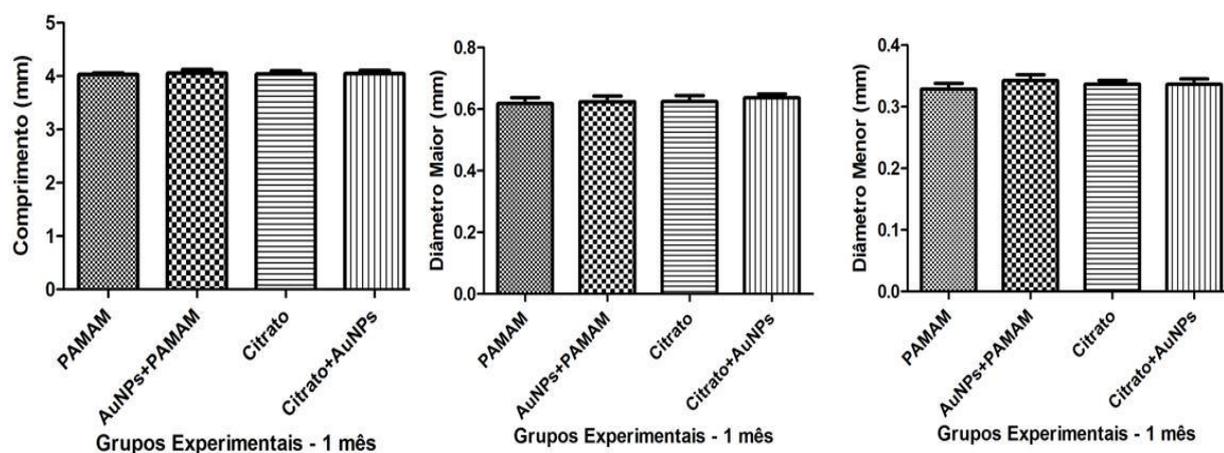


Figura 15 - Representação Esquemática dos valores de parâmetros biométricos dos fêmures dos animais após um mês de tratamento dos diferentes grupos experimentais. O teste paramétrico One Way Anova não detectou diferenças significativas entre os grupos para $p < 0,05$.

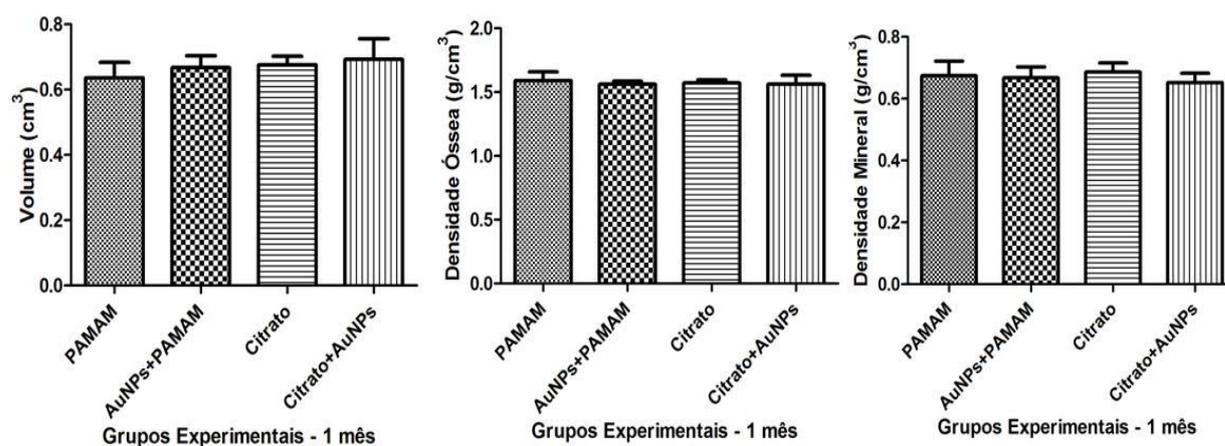


Figura 16 - Representação Esquemática dos valores de parâmetros biofísicos dos fêmures dos animais após um mês de tratamento dos diferentes grupos experimentais. O teste paramétrico One Way Anova não detectou diferenças significativas entre os grupos para $p < 0,05$.

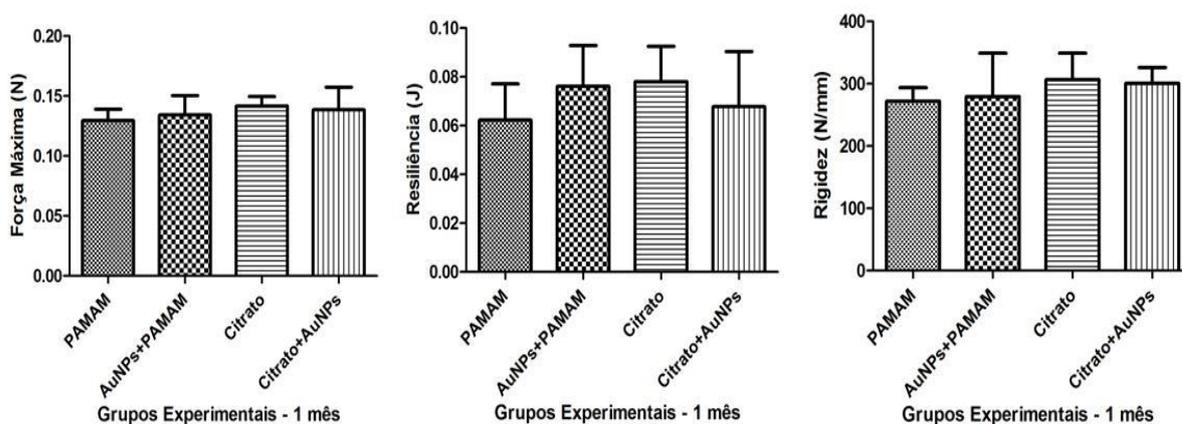


Figura 17 - Representação Esquemática dos valores de parâmetros biomecânicos dos fêmures dos animais após um mês de tratamento dos diferentes grupos experimentais. O teste paramétrico One Way Anova não detectou diferenças significativas entre os grupos para $p < 0,05$.

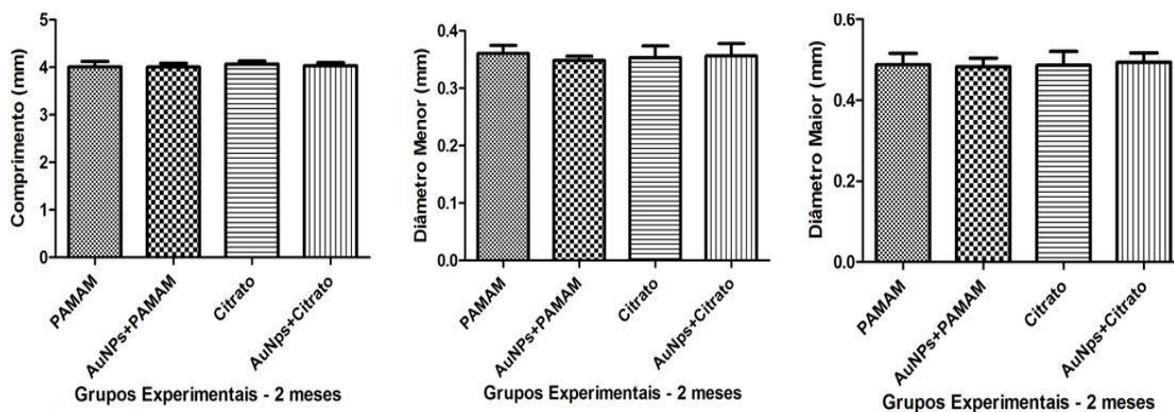


Figura 18 - Representação Esquemática dos valores de parâmetros biométricos dos fêmures dos animais após dois meses de tratamento dos diferentes grupos experimentais. O teste paramétrico One Way Anova não detectou diferenças significativas entre os grupos para $p < 0,05$.

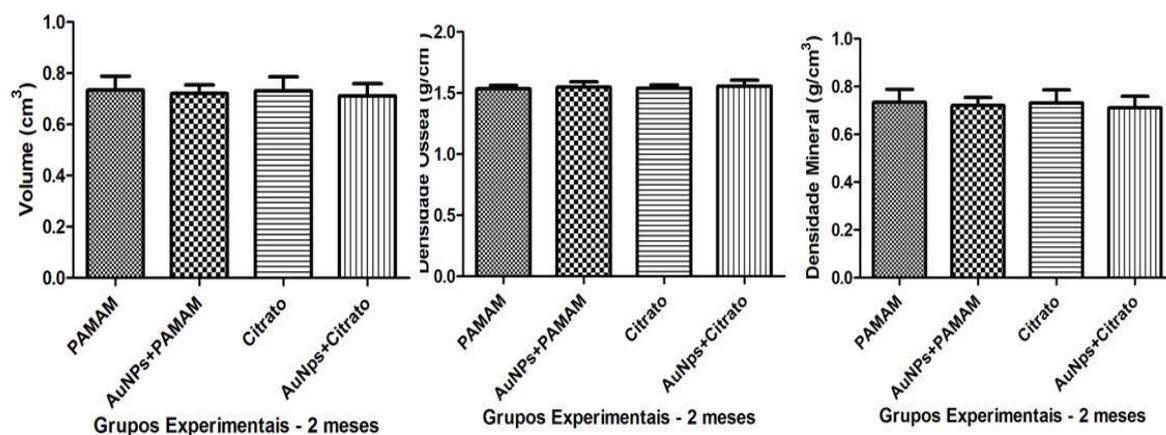


Figura 19 - Representação Esquemática dos valores de parâmetros biofísicos dos fêmures dos animais após dois meses de tratamento dos diferentes grupos experimentais. O teste paramétrico One Way Anova não detectou diferenças significativas entre os grupos para $p < 0,05$.

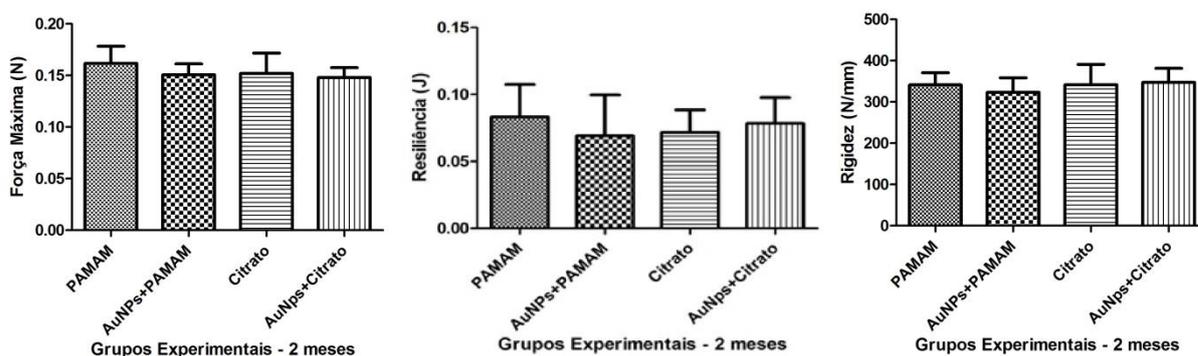


Figura 20 - Representação Esquemática dos valores de parâmetros biomecânicos dos fêmures dos animais após dois meses de tratamento dos diferentes grupos experimentais. O teste paramétrico One Way Anova não detectou diferenças significativas entre os grupos para $p < 0,05$.

5.3. Peso Úmido dos Órgãos

Podem-se observar nas tabelas 5, 6 e 7 os valores das massas do rim, fígado e coração dos animais de cada grupo: PAMAM, PAMAM+AuNPs, Citrato e Citrato+AuNPs nos tempos de uma semana, um mês e dois meses. Apesar das diferenças nos tamanhos das NPs, não houve diferenças significativas entre os grupos nos seus respectivos períodos de tratamento.

Tabela 5: Massa do rim, fígado e coração dos animais dos grupos PAMAM, AuNPs+PAMAM, Citrato e AuNPs+Citrato, eutanasiados uma semana após a injeção de AuNPs.

Órgãos	PAMAM	AuNPs+PAMAM	Citrato	AuNPs+Citrato
Rim (g/100 g)	0,31±0,01 (8)	0,30 ±0,01 (8)	0,31±0,01 (10)	0,32 ±0,02 (10)
Fígado (g/100 g)	2,43 ±0,11 (8)	2,37 ±0,10 (8)	2,51 ±0,23 (10)	2,53 ±0,19 (10)
Coração (g/100 g)	0,31 ±0,01 (8)	0,30 ±0,01 (8)	0,33 ±0,02 (10)	0,32 ±0,03 (10)

Média ± Desvio Padrão; () = n° de animais

Tabela 6: Massa do rim, fígado e coração dos animais dos grupos PAMAM, AuNPs+PAMAM, Citrato e AuNPs+Citrato, eutanasiados um mês após a injeção de AuNPs.

Órgãos	PAMAM	AuNPs+ PAMAM	Citrato	AuNPs+ Citrato
Rim (g/100 g)	0,29±0,020 (9)	0,30 ±0,017 (10)	0,31±0,016 (8)	0,30±0,016 (10)
Fígado (g/100 g)	2,21±0,125 (9)	2,25 ±0,115 (10)	2,34 ±0,172 (8)	2,26 ±0,084 (10)
Coração (g/100 g)	0,30±0,013 (9)	0,30±0,016 (10)	0,29±0,030 (8)	0,31±0,023 (10)

Média ± Desvio Padrão; () = n° de animais

Tabela 7: Massa do rim, fígado e coração dos animais dos grupos PAMAM, AuNPs+PAMAM, Citrato e AuNPs+Citrato, eutanasiados dois meses após a injeção de AuNPs.

Órgãos	PAMAM	AuNPs+PAMAM	Citrato	AuNPs+Citrato
Rim (g/100 g)	0,28±0,020 (7)	0,30±0,016 (8)	0,28±0,021 (9)	0,29±0,029 (10)
Fígado (g/100 g)	2,13±0,114 (7)	2,18±0,156 (8)	2,08±0,189 (9)	2,32±0,369 (10)
Coração (g/100 g)	0,30±0,029 (7)	0,31±0,023 (8)	0,29±0,022 (9)	0,31±0,028 (10)

Média ± Desvio Padrão; () = n° de animais

Os valores dos pesos úmidos dos órgãos (rim, fígado e coração) dos animais dos grupos PAMAM, PAMAM+AuNPs, Citrato e Citrato+AuNPs, uma semana, um mês e dois meses após a administração das nanopartículas podem ser observados nas figuras 21, 22 e 23. Não houve diferenças significativas entre os grupos nos diferentes períodos.

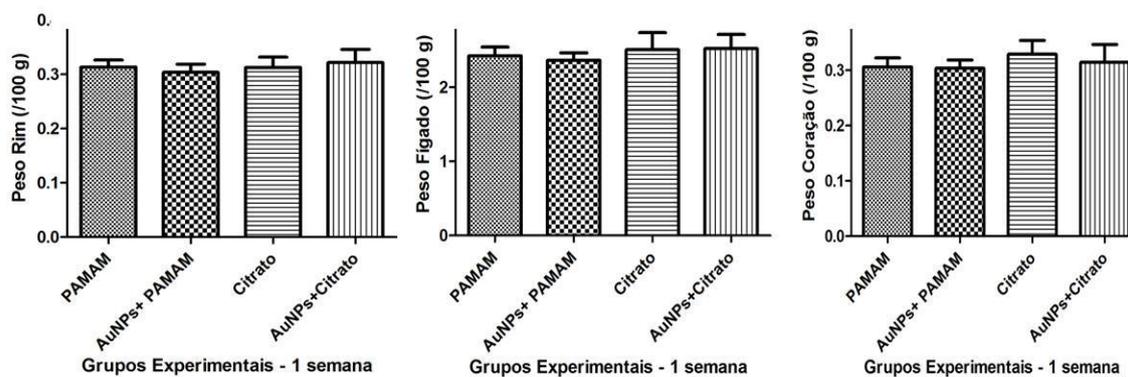


Figura 21- Representação Esquemática dos valores dos pesos dos órgãos (g/100 g) dos animais após uma semana de tratamento dos diferentes grupos experimentais. O teste paramétrico One Way Anova não detectou diferenças significativas entre os grupos para $p < 0,05$.

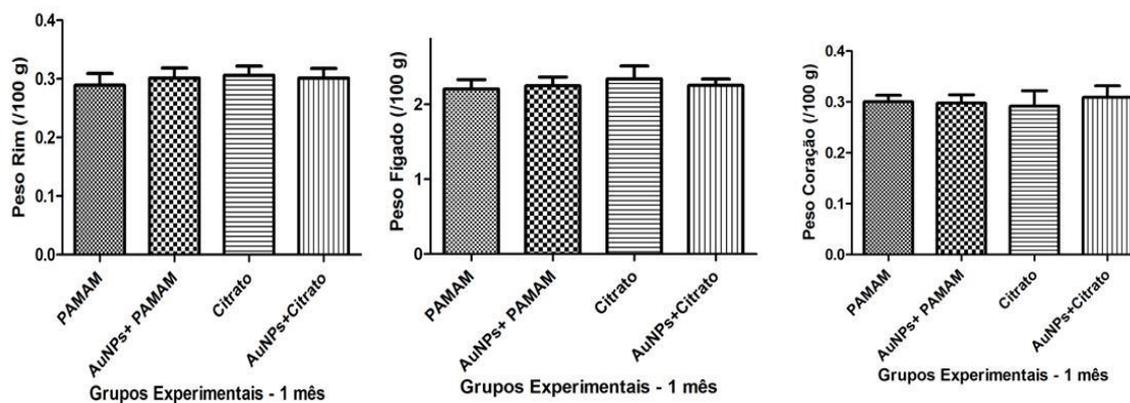


Figura 22 - Representação Esquemática dos valores dos pesos dos órgãos (g/100 g) dos animais após um mês de tratamento dos diferentes grupos experimentais. O teste paramétrico One Way Anova não detectou diferenças significativas entre os grupos para $p < 0,05$.

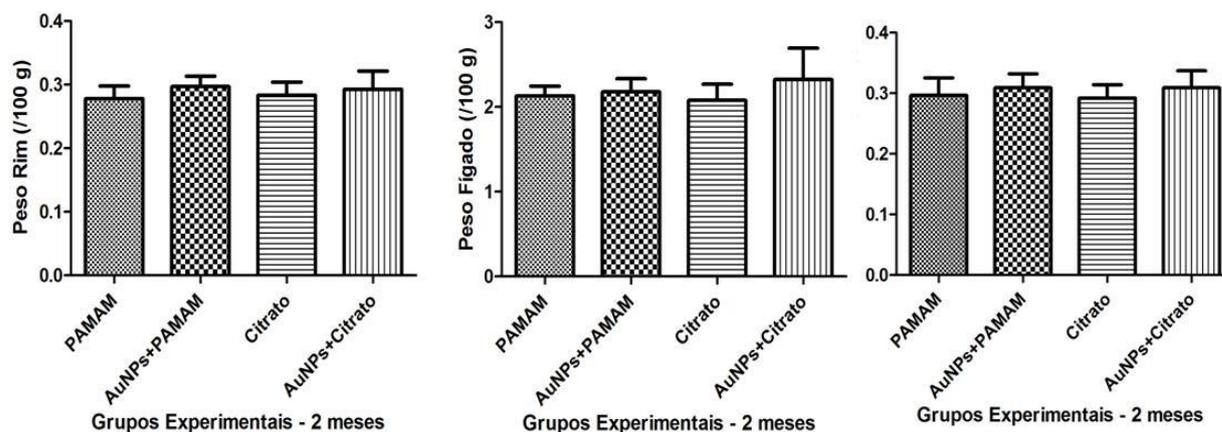


Figura 23 - Representação Esquemática dos valores dos pesos dos órgãos (g/100 g) dos animais após dois meses de tratamento dos diferentes grupos experimentais. O teste paramétrico One Way Anova não detectou diferenças significativas entre os grupos para $p < 0,05$.

6. DISCUSSÃO

O modelo de tratamento por meio de injeção intravenosa, considerado por SEMMLER-BEHNKE *et al.* (2008) como a principal via para pesquisas *in vivo*, obteve fácil adaptação dos animais, não causando alterações significativas da massa corporal nem do comportamento, e com baixo índice de mortalidade.

Foi recomendado que investigações *in vivo* devessem incluir indicadores gerais de saúde, tais como: comportamento, perda de massa corporal, porcentagem de mortalidade e expectativa de vida (BURR, ROBLING & TURNER, 2002). Estudos em animais monitorados constituem um passo essencial para a extrapolação de efeitos biológicos para a segurança da saúde humana (CELIK, OGENLER & COMELEKOGU, 2005).

A homogeneidade da massa corporal é uma variável importante, pois a massa corporal exerce estresse mecânico sobre os ossos e contribui para o ganho de massa óssea (BURR, ROBLING & TURNER, 2002). Os diferentes tratamentos não modificaram o ganho de massa corporal dos animais. Nossos achados corroboram os resultados de outros autores que não encontraram alteração da massa corporal dos animais tratados com AuNPs (LASAGNA-REEVES *et al.*, 2010; MORAIS *et al.*, 2012). Lembrando que os animais na idade adulta continuam a crescer, o tratamento com as AuNPs não influenciou o desenvolvimento ósseo dos animais, pois os parâmetros biométricos e biofísicos foram semelhantes entre os animais dos diferentes grupos experimentais.

Foi constatado que AuNPs de diferentes tamanhos (4, 12 e 18 nm), apesar de serem levadas por células humanas, não causaram quaisquer prejuízos aos animais (CONNOR *et al.*, 2005). Em um estudo de toxicidade de AuNPs cobertas com citrato em vários tamanhos (3, 5, 8, 12, 17, 37, 50 e 100nm) em camundongos, foi constatado que os tamanhos menores (3 e 5 nm) e os maiores (50 e 100 nm) não foram prejudiciais à saúde dos animais, na dose utilizada. No entanto, foi percebido pelos autores que o intervalo de tamanho entre 8 e 37 nm, causaram efeitos letais aos animais, induzindo doença grave relacionada à danos ao fígado, baço e pulmão, perda de apetite, perda de massa corporal, alteração da cor da pele e redução da expectativa de vida (CHEN *et al.*, 2009). Estes dados conflitantes podem refletir uma não padronização dos protocolos experimentais resultantes das diferentes condições experimentais

encontradas na literatura. Ademais, estas diferenças podem ser devido à variável biodisponibilidade das AuNPs (OSTROWSKI *et al.*, 2009).

Além disso, vários fatores fisiológicos, físicos e químicos (forma, tamanho e superfície da nanopartícula), variações do período de tratamento, dose, via de administração de nanomateriais, entre outros, que estariam envolvidos na determinação de quanto da massa de AuNPs administrada ficaria retida no organismo. Esta massa retida poderia interagir com diversos sistemas, prejudicando o desenvolvimento e o ganho de massa corporal dos animais utilizados em diferentes experimentos (POWERS *et al.*, 2006).

Neste estudo, foram utilizadas AuNPs conjugadas com PAMAM no tamanho de $6\pm 0,2$ nm de diâmetro e AuNPs estabilizadas com citrato apresentando $18,2\pm 0,4$ nm de tamanho. Nossos resultados foram semelhantes nos diferentes tratamentos, indicando que o tamanho das partículas não influenciou os diferentes tecidos analisados.

Os resultados obtidos neste experimento com os animais dos grupos tratados com AuNPs+PAMAM e apenas com o estabilizante PAMAM, não exibiram alterações em nenhum dos parâmetros analisados com o fêmur direito de ratos, indicando que AuNPs estabilizadas com PAMAM, na dose utilizada, não influenciaram a qualidade óssea dos animais, independente do tempo de exposição. Efeitos semelhantes foram obtidos com a massa dos diferentes órgãos.

No entanto, é fundamental distinguir entre os efeitos das AuNPs e dos estabilizantes (DANIEL & ASTRUC, 2004), lembrando que uma possível toxicidade *in vivo* dos dendrímeros ainda não foi sistematicamente investigada (HEIDEN *et al.*, 2007). Outros estudos sobre a possível influência dos estabilizantes das AuNPs, foram analisadas com biotina, cisteína, citrato, glicose, que não apresentaram efeitos tóxicos sobre células leucêmicas K562, em contraste com soluções de ácido cloroáurico (HAuCl₄), que demonstraram serem tóxicas para 90% das células (CONNOR *et al.*, 2005).

Em nosso estudo, os animais tratados com AuNPs+citrato, não exibiram alterações de nenhum dos parâmetros analisados em comparação aos fêmures daqueles tratados com citrato. Estes resultados indicam que as AuNPs+citrato na dose utilizada, não influenciaram na qualidade óssea dos animais.

Em um experimento *in vitro*, foram relatadas alterações morfológicas e funcionais dos osteócitos MLOY4 quando expostos a uma variedade de nanomateriais, incluindo nanopartículas de ouro e prata. Tais modificações envolviam tamanho, forma e funções destas células (MAHMOOD *et al.*, 2010).

Em contrapartida, SUL *et al.* (2010) constataram a ação de AuNPs como antioxidantes, reduzindo a formação de espécies reativas de oxigênio. Este processo poderia inibir a formação de osteoclastos. Porém, não foram observados tais efeitos nos fêmures dos animais deste estudo, pois não houve diferenças significativas dos parâmetros biofísicos ou biomecânicos.

Os resultados obtidos com a massa dos órgãos (rim, fígado e coração) dos animais dos grupos tratados com AuNPs+Citrato e apenas com o estabilizante citrato, não exibiram variações significativas em nenhum dos períodos de tratamento, indicando que AuNPs estabilizadas com citrato, na dose utilizada, não influenciaram a massa dos órgãos dos animais.

Os pesquisadores BALASUBRAMANIAN *et al.* (2010) em um estudo de biodistribuição, observaram a presença de AuNPs+Citrato com 40 nm de diâmetro na dose de 0,01 mg Au/kg MC, após o tratamento com injeção *i.v* com volume de 0,2 mL nos ossos, rim, fígado e coração de ratos.

Nosso trabalho é relevante em virtude de poucos estudos *in vivo* voltados aos efeitos de AuNPs sobre o tecido ósseo propriamente dito, pois a maioria dos relatos existentes na literatura enfocam apenas as células do tecido ósseo *in vitro*, e também por indicar que AuNPs estabilizadas com PAMAM ou citrato na dose similar à de uma exposição ambiental mesmo com diferentes tamanhos, não influenciaram a massa dos órgãos como o fígado, rim e coração, corroborando com os achados de (LASAGNA-REEVES *et al.*, 2010).

7. CONCLUSÕES

Este estudo demonstrou que as AuNPs com $6,1\pm 0,2$ nm esféricas, estabilizadas pelo dendrímero PAMAM-G4 e as AuNPs $18,2\pm 0,4$ nm esféricas estabilizadas com citrato não modificaram a massa dos órgãos analisados (rim, fígado e coração) como também não causaram alterações ósseas nos fêmures de ratos tratados com uma única injeção intravenosa com volume de 0,4 mL na dose de 0,01 mg Au/kg MC, analisados após uma semana, um mês e dois meses. Portanto, os resultados apontaram que a dose de AuNPs utilizada neste estudo não prejudicou os órgãos e a qualidade do tecido ósseo.

Estes resultados podem auxiliar no entendimento de possíveis ações de AuNPs sobre os órgãos e o tecido ósseo, em uma situação de exposição ambiental, tendo em vista sua crescente utilização em diversas situações comerciais e médicas, incluindo a iminência de seu uso como marcadores de microlesões ósseas por imagem 3D e de novas terapias voltadas à desordens ósseas, minimizando ou evitando eventuais efeitos nocivos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGASHE, H. B.; DUTTA, T.; GARG, M.; JAIN, N. K. Investigations on the toxicological profile of functionalized fifth-generation poly (propylene imine) dendrimer. **J Pharm Pharmacol**, v. 58, n. 11, p. 1491-8, Nov 2006.

AKHTER, M. P.; IWANIEC, U. T.; HAYNATZKI, G. R.; FUNG, Y. K.; CULLEN, D. M.; RECKER, R. R. Effects of nicotine on bone mass and strength in aged female rats. **J Orthop Res**, v. 21, n. 1, p. 14-9, Jan 2003.

ALKILANY, A. M.; MURPHY, C. J. Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: what we have learned so far? **J Nanopart Res**, v. 12, n. 7, p. 2313-2333, Sep 2010.

BALASUBRAMANIAN, S. K.; JITTIWAT, J.; MANIKANDAN, J.; ONG, C. N.; YU, L. E.; ONG, W. Y. Biodistribution of gold nanoparticles and gene expression changes in the liver and spleen after intravenous administration in rats. **Biomaterials**, v. 31, n. 8, p. 2034-42, Mar 2010.

BERGEN, J. M.; VON RECUM, H. A.; GOODMAN, T. T.; MASSEY, A. P.; PUN, S. H. Gold nanoparticles as a versatile platform for optimizing physicochemical parameters for targeted drug delivery. **Macromol Biosci**, v. 6, n. 7, p. 506-16, Jul 14 2006.

BISWAS, P.; WU, C. Y. Nanoparticles and the environment. **J Air Waste Manag Assoc**, v. 55, n. 6, p. 708-46, Jun 2005.

BLAIR, H. C. How the osteoclast degrades bone. **Bioessays**, v. 20, n. 10, p. 837-46, Oct 1998.

BOISSELIER, E.; ASTRUC, D. Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity. **Chem Soc Rev**, v. 38, n. 6, p. 1759-82, Jun 2009.

BORM, P.; KLAESSIG, F. C.; LANDRY, T. D.; MOUDGIL, B.; PAULUHN, J.; THOMAS, K.; TROTTIER, R.; WOOD, S. Research strategies for safety evaluation of nanomaterials, part V: role of dissolution in biological fate and effects of nanoscale particles. **Toxicol Sci**, v. 90, n. 1, p. 23-32, Mar 2006.

BUCKWALTER, J. A.; GLIMCHER, M. J.; COOPER, R. R.; RECKER, R. Bone biology. I: Structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization. **Instr Course Lect**, v. 45, p. 371-86, 1996.

BURR, D. B.; ROBLING, A. G.; TURNER, C. H. Effects of biomechanical stress on bones in animals. **Bone**, v. 30, n. 5, p. 781-6, May 2002.

CELIK, A.; OGENLER, O.; COMELEKOGLU, U. The evaluation of micronucleus frequency by acridine orange fluorescent staining in peripheral blood of rats treated with lead acetate. **Mutagenesis**, v. 20, n. 6, p. 411-5, Nov 2005.

CHEN, Y. S.; HUNG, Y. C.; LIAU, I.; HUANG, G. S. Assessment of the In Vivo Toxicity of Gold Nanoparticles. **Nanoscale Res Lett**, v. 4, n. 8, p. 858-864, 2009.

CHITHRANI, B. D.; CHAN, W. C. Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes. **Nano Lett**, v. 7, n. 6, p. 1542-50, Jun 2007.

CHO, W. S.; CHO, M.; JEONG, J.; CHOI, M.; HAN, B. S.; SHIN, H. S. *et al.* Size-dependent tissue kinetics of PEG-coated gold nanoparticles. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 245, n. 1, p. 116-23, May 15 2010.

CHOI, H. S.; LIU, W.; MISRA, P.; TANAKA, E.; ZIMMER, J. P.; ITTY IPE, B.; BAWENDI, M. G.; FRANGIONI, J. V. Renal clearance of quantum dots. **Nat Biotechnol**, v. 25, n. 10, p. 1165-70, Oct 2007.

COLVIN, V. L. The potential environmental impact of engineered nanomaterials. **Nat Biotechnol**, v. 21, n. 10, p. 1166-70, Oct 2003.

COMPSTON, J. E. Sex steroids and bone. **Physiol Rev**, v. 81, n. 1, p. 419-447, Jan 2001.

CONNOR, E. E.; MWAMUKA, J.; GOLE, A.; MURPHY, C. J.; WYATT, M. D. Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity. **Small**, v. 1, n. 3, p. 325-7, Mar 2005.

CRESPILHO, F. N.; GHICA, M. E.; GOUVEIA-CARIDADE, C.; OLIVEIRA, O. N., JR.; BRETT, C. M. Enzyme immobilisation on electroactive nanostructured membranes (ENM): optimised architectures for biosensing. **Talanta**, v. 76, n. 4, p. 922-8, Aug 15 2008.

DANIEL, M. C.; ASTRUC, D. Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. **Chem Rev**, v. 104, n. 1, p. 293-346, Jan 2004.

DE JONG, W. H.; HAGENS, W. I.; KRYSTEK, P.; BURGER, M. C.; SIPS, A. J.; GEERTSMA, R. E. Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration. **Biomaterials**, v. 29, n. 12, p. 1912-9, Apr 2008.

DIRECT, S. ISI Web of Science direct. 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/>>. Acesso em: 10 de Novembro de 2011.

DOBROVOLSKAIA, M. A.; PATRI, A. K.; ZHENG, J.; CLOGSTON, J. D.; AYUB, N.; AGGARWAL, P. *et al.* Interaction of colloidal gold nanoparticles with human blood: effects on particle size and analysis of plasma protein binding profiles. **Nanomedicine**, v. 5, n. 2, p. 106-17, Jun 2009.

DOREA, J. G.; DONANGELO, C. M. Early (in uterus and infant) exposure to mercury and lead. **Clin Nutr**, v. 25, n. 3, p. 369-76, Jun 2006.

DROBNE, D. Nanotoxicology for safe and sustainable nanotechnology. **Arh Hig Rada Toksikol**, v. 58, n. 4, p. 471-8, Dec 2007.

EL-ANSARY, A.; AL-DAIHAN, S. On the toxicity of therapeutically used nanoparticles: an overview. **J Toxicol**, v. 2009, p. 754810, 2009.

ENGESAETER, L. B.; EKELAND, A.; LANGELAND, N. Methods for testing the mechanical properties of the rat femur. **Acta Orthop Scand**, v. 49, n. 6, p. 512-8, Dec 1978.

ENGINEERING, T. R. S. T. R. A. O. Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties. **Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties**, v. July, 2004.

ESTEVEES, A. C. C.; TIMMONS, A. B.; TRINDADE, T. Nanocompósitos de matriz polimérica: estratégias de síntese de materiais híbridos. **Química Nova**, v. 27, n. 8, 2004.

FARADAY, M. The Bakerian Lecture: Experimental Relations of Gold (and Other Metals) to Light. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, v. 147, n. ArticleType: research-article / Full publication date: 1857 /, p. 145-181, 1857.

FERNANDEZ-TRESGUERRES-HERNANDEZ-GIL, I.; ALOBERA-GRACIA, M. A.; DEL-CANTO-PINGARRON, M.; BLANCO-JEREZ, L. Physiological bases of bone regeneration II. The remodeling process. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v. 11, n. 2, p. E151-7, Mar 2006.

FERRARI, M. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. **Nat Rev Cancer**, v. 5, n. 3, p. 161-71, Mar 2005.

FISCHER, H. C.; CHAN, W. C. Nanotoxicity: the growing need for in vivo study. **Curr Opin Biotechnol**, v. 18, n. 6, p. 565-71, Dec 2007.

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**, v. 113, n. 11, p. 1555-60, Nov 2005.

GOODMAN, C. M.; MCCUSKER, C. D.; YILMAZ, T.; ROTELLO, V. M. Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains. **Bioconjug Chem**, v. 15, n. 4, p. 897-900, Jul-Aug 2004.

GRATTON, S. E.; ROPP, P. A.; POHLHAUS, P. D.; LUFT, J. C.; MADDEN, V. J.; NAPIER, M. E.; DESIMONE, J. M. The effect of particle design on cellular internalization pathways. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 33, p. 11613-8, Aug 19 2008.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiología Médica**. 2002.

HAGENS, W. I.; OOMEN, A. G.; DE JONG, W. H.; CASSEE, F. R.; SIPS, A. J. What do we (need to) know about the kinetic properties of nanoparticles in the body? **Regul Toxicol Pharmacol**, v. 49, n. 3, p. 217-29, Dec 2007.

HAINFELD, J. F.; SLATKIN, D. N.; FOCELLA, T. M.; SMILOWITZ, H. M. Gold nanoparticles: a new X-ray contrast agent. **Br J Radiol**, v. 79, n. 939, p. 248-53, Mar 2006.

HEIDEN, T. C.; DENGLER, E.; KAO, W. J.; HEIDEMAN, W.; PETERSON, R. E. Developmental toxicity of low generation PAMAM dendrimers in zebrafish. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 225, n. 1, p. 70-9, Nov 15 2007.

HELMUS, M. N. The need for rules and regulations. **Nat Nanotechnol**, v. 2, n. 6, p. 333-4, Jun 2007.

HILLYER, J. F.; ALBRECHT, R. M. Gastrointestinal persorption and tissue distribution of differently sized colloidal gold nanoparticles. **J Pharm Sci**, v. 90, n. 12, p. 1927-36, Dec 2001.

HOET, P. H.; BRUSKE-HOHLFELD, I.; SALATA, O. V. Nanoparticles - known and unknown health risks. **J Nanobiotechnology**, v. 2, n. 1, p. 12, Dec 8 2004.

HONG, S.; BIELINSKA, A. U.; MECKE, A.; KESZLER, B.; BEALS, J. L.; SHI, X. *et al.* Interaction of poly(amidoamine) dendrimers with supported lipid bilayers and cells: hole formation and the relation to transport. **Bioconjug Chem**, v. 15, n. 4, p. 774-82, Jul-Aug 2004.

HSIAO, I. L.; HUANG, Y. J. Effects of various physicochemical characteristics on the toxicities of ZnO and TiO nanoparticles toward human lung epithelial cells. **Sci Total Environ**, v. 409, n. 7, p. 1219-28, Mar 1 2011.

HU, M.; CHEN, J.; LI, Z. Y.; AU, L.; HARTLAND, G. V.; LI, X.; MARQUEZ, M.; XIA, Y. Gold nanostructures: engineering their plasmonic properties for biomedical applications. **Chem Soc Rev**, v. 35, n. 11, p. 1084-94, Nov 2006.

JONES, C. F.; GRAINGER, D. W. In vitro assessments of nanomaterial toxicity. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 61, n. 6, p. 438-56, Jun 21 2009.

KHAN, J. A.; PILLAI, B.; DAS, T. K.; SINGH, Y.; MAITI, S. Molecular effects of uptake of gold nanoparticles in HeLa cells. **ChemBiochem**, v. 8, n. 11, p. 1237-40, Jul 23 2007.

KIPEN, H. M.; LASKIN, D. L. Smaller is not always better: nanotechnology yields nanotoxicology. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 289, n. 5, p. L696-7, Nov 2005.

LASAGNA-REEVES, C.; GONZALEZ-ROMERO, D.; BARRIA, M. A.; OLMEDO, I.; CLOS, A.; SADAGOPA RAMANUJAM, V. M. *et al.* Bioaccumulation and toxicity of gold nanoparticles after repeated administration in mice. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 393, n. 4, p. 649-55, Mar 19 2010.

LEI, R.; WU, C.; YANG, B.; MA, H.; SHI, C.; WANG, Q.; YUAN, Y.; LIAO, M. Integrated metabolomic analysis of the nano-sized copper particle-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity in rats: a rapid in vivo screening method for nanotoxicity. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 232, n. 2, p. 292-301, Oct 15 2008.

LEWINSKI, N.; COLVIN, V.; DREZEK, R. Cytotoxicity of nanoparticles. **Small**, v. 4, n. 1, p. 26-49, Jan 2008.

LONGMIRE, M.; CHOYKE, P. L.; KOBAYASHI, H. Clearance properties of nano-sized particles and molecules as imaging agents: considerations and caveats. **Nanomedicine (Lond)**, v. 3, n. 5, p. 703-17, Oct 2008.

LUNDQVIST, M.; STIGLER, J.; ELIA, G.; LYNCH, I.; CEDERVALL, T.; DAWSON, K. A. Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 38, p. 14265-70, Sep 23 2008.

MAHMOOD, M.; CASCIANO, D. A.; 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**, v. 30, n. 1, p. 74-83, Jan 2010.

MARCUS, R. Clinical review 76: The nature of osteoporosis. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 81, n. 1, p. 1-5, Jan 1996.

MARTIN, R. B. Effects of simulated weightlessness on bone properties in rats. **J Biomech**, v. 23, n. 10, p. 1021-9, 1990.

MAYNARD, A. D.; AITKEN, R. J.; BUTZ, T.; COLVIN, V.; DONALDSON, K.; OBERDORSTER, G. *et al.* Safe handling of nanotechnology. **Nature**, v. 444, n. 7117, p. 267-9, Nov 16 2006.

MELO, C. P.; PIMENTA, M. Nanociência e Nanotecnologia. **Parcerias Estratégicas**, v. 18, n. 13, 2004.

MORAIS, T.; SOARES, M. E.; DUARTE, J. A.; SOARES, L.; MAIA, S.; GOMES, P. *et al.* Effect of surface coating on the biodistribution profile of gold nanoparticles in the rat. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 80, n. 1, p. 185-93, Jan 2012.

MORI, S.; BURR, D. B. Increased intracortical remodeling following fatigue damage. **Bone**, v. 14, n. 2, p. 103-9, Mar-Apr 1993.

MURPHY, C. J.; GOLE, A. M.; STONE, J. W.; SISCO, P. N.; ALKILANY, A. M.; GOLDSMITH, E. C.; BAXTER, S. C. Gold nanoparticles in biology: beyond toxicity to cellular imaging. **Acc Chem Res**, v. 41, n. 12, p. 1721-30, Dec 2008.

MUSEUM, T. O. T. B. Lycurgus Cup. 2012. Disponível em: < www.thebritishmuseum.ac.uk/science/lycurguscup/sr.lycurgus-p1.html >.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (US) BOARD ON BIOLOGY, Ed. **Privacy Issues in Biomedical and Clinical Research**. National Academies Press (US). Washington (DC), National Academies Press (US), 2010/09/17 ed. 1998.

NCI announces major commitment to Nanotechnology for Cancer Research. **Oncology-New York**, v. 18, n. 11, p. 1339-1339, Oct 2004.

NEL, A.; XIA, T.; MADLER, L.; LI, N. Toxic potential of materials at the nanolevel. **Science**, v. 311, n. 5761, p. 622-7, Feb 3 2006.

NEYRINCK, A. Modulation of Kupffer cell activity: physio-pathological consequences on hepatic metabolism. **Bull Mem Acad R Med Belg**, v. 159, n. 5-6, p. 358-66, 2004.

OBERDORSTER, G.; OBERDORSTER, E.; OBERDORSTER, J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. **Environ Health Perspect**, v. 113, n. 7, p. 823-39, Jul 2005.

OBERDÖRSTER, G.; STONE, V.; DONALDSON, K. Toxicology of nanoparticles: A historical perspective. **Nanotoxicology**, v. 1, n. 1, p. 2-25, 2007.

OSTROWSKI, A. D.; MARTIN, T.; CONTI, J.; HURT, I.; HARTHORN, B. H. Nanotoxicology: characterizing the scientific literature, 2000-2007. **J Nanopart Res**, v. 11, n. 2, p. 251-257, Feb 2009.

PACIOTTI, G. F.; MYER, L.; WEINREICH, D.; GOIA, D.; PAVEL, N.; MCLAUGHLIN, R. E.; TAMARKIN, L. Colloidal gold: a novel nanoparticle vector for tumor directed drug delivery. **Drug Deliv**, v. 11, n. 3, p. 169-83, May-Jun 2004.

PAN, Y.; NEUSS, S.; LEIFERT, A.; FISCHLER, M.; WEN, F.; SIMON, U. *et al.* Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles. **Small**, v. 3, n. 11, p. 1941-9, Nov 2007.

PATRA, C. R.; BHATTACHARYA, R.; WANG, E.; KATARYA, A.; LAU, J. S.; DUTTA, S. *et al.* Targeted delivery of gemcitabine to pancreatic adenocarcinoma using cetuximab as a targeting agent. **Cancer Res**, v. 68, n. 6, p. 1970-8, Mar 15 2008.

PATRA, H. K.; BANERJEE, S.; CHAUDHURI, U.; LAHIRI, P.; DASGUPTA, A. K. Cell selective response to gold nanoparticles. **Nanomedicine**, v. 3, n. 2, p. 111-9, Jun 2007.

PENG, Z.; TUUKKANEN, J.; ZHANG, H.; JAMSA, T.; VAANANEN, H. K. The mechanical strength of bone in different rat models of experimental osteoporosis. **Bone**, v. 15, n. 5, p. 523-32, Sep-Oct 1994.

PERNODET, N.; FANG, X.; SUN, Y.; BAKHTINA, A.; RAMAKRISHNAN, A.; SOKOLOV, J.; ULMAN, A.; RAFAILOVICH, M. Adverse effects of citrate/gold nanoparticles on human dermal fibroblasts. **Small**, v. 2, n. 6, p. 766-73, Jun 2006.

PISTOLIS, G.; MALLIARIS, A.; TSIOURVAS, D.; PALEOS, C. M. Poly(propyleneimine) Dendrimers as pH-Sensitive Controlled-Release Systems. **Chemistry – A European Journal**, v. 5, n. 5, p. 1440-1444, 1999.

POSNER, A. S. The structure of bone apatite surfaces. **J Biomed Mater Res**, v. 19, n. 3, p. 241-50, Mar 1985.

POWERS, K. W.; BROWN, S. C.; KRISHNA, V. B.; WASDO, S. C.; MOUDGIL, B. M.; ROBERTS, S. M. Research strategies for safety evaluation of nanomaterials. Part VI. Characterization of nanoscale particles for toxicological evaluation. **Toxicol Sci**, v. 90, n. 2, p. 296-303, Apr 2006.

RAJI, V.; KUMAR, J.; REJIYA, C. S.; VIBIN, M.; SHENOI, V. N.; ABRAHAM, A. Selective photothermal efficiency of citrate capped gold nanoparticles for destruction of cancer cells. **Exp Cell Res**, v. 317, n. 14, p. 2052-8, Aug 15 2011.

RAYAVARAPU, R. G.; PETERSEN, W.; UNGUREANU, C.; POST, J. N.; VAN LEEUWEN, T. G.; MANOHAR, S. Synthesis and bioconjugation of gold nanoparticles as potential molecular probes for light-based imaging techniques. **Int J Biomed Imaging**, v. 2007, p. 29817, 2007.

REPORT, T. N. O. **The Nanotechnology Opportunity Report (NOR) 2008**. 2008

RITTNER, K.; BENAVENTE, A.; BOMPARD-SORLET, A.; HEITZ, F.; DIVITA, G.; BRASSEUR, R.; JACOBS, E. New basic membrane-destabilizing peptides for plasmid-based gene delivery in vitro and in vivo. **Mol Ther**, v. 5, n. 2, p. 104-14, Feb 2002.

ROBERTS, J. C.; BHALGAT, M. K.; ZERA, R. T. Preliminary biological evaluation of polyamidoamine (PAMAM) Starburst dendrimers. **J Biomed Mater Res**, v. 30, n. 1, p. 53-65, Jan 1996.

ROBLING, A. G.; TURNER, C. H. Mechanotransduction in bone: genetic effects on mechanosensitivity in mice. **Bone**, v. 31, n. 5, p. 562-9, Nov 2002.

ROCO, M. C. International strategy for Nanotechnology Research. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 3, n. 5, p. 353-360, 2001.

ROONEY, P.; REZAEI, A.; XU, S.; MANIFAR, T.; HASSANZADEH, A.; PODOPRYGORINA, G. *et al.* Control of surface plasmon resonances in dielectrically coated proximate gold nanoparticles immobilized on a substrate. **Physical Review B**, v. 77, n. 23, p. 235446, 2008.

ROTHEN-RUTISHAUSER, B. M.; 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**, v. 40, n. 14, p. 4353-9, Jul 15 2006.

RYMAN-RASMUSSEN, J. P.; RIVIERE, J. E.; MONTEIRO-RIVIERE, N. A. Variables influencing interactions of untargeted quantum dot nanoparticles with skin cells and identification of biochemical modulators. **Nano Lett**, v. 7, n. 5, p. 1344-8, May 2007.

SEMMLER-BEHNKE, M.; KREYLING, W. G.; LIPKA, J.; FERTSCH, S.; WENK, A.; TAKENAKA, S.; SCHMID, G.; BRANDAU, W. Biodistribution of 1.4- and 18-nm gold particles in rats. **Small**, v. 4, n. 12, p. 2108-11, Dec 2008.

SHAN, J.; TENHU, H. Recent advances in polymer protected gold nanoparticles: synthesis, properties and applications. **Chem Commun (Camb)**, n. 44, p. 4580-98, Nov 28 2007.

SHEA, J. E.; MILLER, S. C. Skeletal function and structure: implications for tissue-targeted therapeutics. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 57, n. 7, p. 945-57, May 25 2005.

SHIMANO, M. M.; SHIMANO, A. C.; VOLPON, J. B. Histerese de fêmures de ratas submetidas a ensaio de flexão, em diferentes faixas etárias. **Revista Brasileira de Engenharia Biomédica**, v. 18, n. 2, p. 89-97, 2002.

SHUKLA, R.; BANSAL, V.; CHAUDHARY, M.; BASU, A.; BHONDE, R. R.; SASTRY, M. Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: a microscopic overview. **Langmuir**, v. 21, n. 23, p. 10644-54, Nov 8 2005.

SILVA, A. H.; PIZZOL, C. D.; CRECZYNSKI-PASA, T. B.; RAMOS, B. G. Z. Nanotecnologia: Paradigma Entre Benefícios e Riscos. 2012. Disponível em: < www.google.com >.

SMITH, A. M.; GAO, X.; NIE, S. Quantum dot nanocrystals for in vivo molecular and cellular imaging. **Photochem Photobiol**, v. 80, n. 3, p. 377-85, Nov-Dec 2004.

SOGAARD, C. H.; MOSEKILDE, L.; THOMSEN, J. S.; RICHARDS, A.; MCOSKER, J. E. A comparison of the effects of two anabolic agents (fluoride and PTH) on ash density and bone strength assessed in an osteopenic rat model. **Bone**, v. 20, n. 5, p. 439-49, May 1997.

STERN, S. T.; MCNEIL, S. E. Nanotechnology safety concerns revisited. **Toxicol Sci**, v. 101, n. 1, p. 4-21, Jan 2008.

SUL, O. J.; KIM, J. C.; KYUNG, T. W.; KIM, H. J.; KIM, Y. Y.; KIM, S. H.; KIM, J. S.; CHOI, H. S. Gold nanoparticles inhibited the receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL)-induced osteoclast formation by acting as an antioxidant. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 74, n. 11, p. 2209-13, 2010.

THOMAS, T.; THOMAS, K.; SADRIEH, N.; SAVAGE, N.; ADAIR, P.; BRONAUGH, R. Research strategies for safety evaluation of nanomaterials, part VII: evaluating consumer exposure to nanoscale materials. **Toxicol Sci**, v. 91, n. 1, p. 14-9, May 2006.

TURKEVICH, J.; STEVENSON, P. C.; HILLIER, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. **Discussions of the Faraday Society**, v. 11, p. 55-75, 1951.

USKOKOVIC, V.; USKOKOVIC, D. P. Nanosized hydroxyapatite and other calcium phosphates: chemistry of formation and application as drug and gene delivery agents. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v. 96, n. 1, p. 152-91, Jan 2011.

VILLIERS, C.; FREITAS, H.; COUDERC, R.; VILLIERS, M. B.; MARCHE, P. Analysis of the toxicity of gold nano particles on the immune system: effect on dendritic cell functions. **J Nanopart Res**, v. 12, n. 1, p. 55-60, Jan 2010.

WANG, D.; MILLER, S. C.; KOPECKOVA, P.; KOPECEK, J. Bone-targeting macromolecular therapeutics. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 57, n. 7, p. 1049-76, May 25 2005.

WIESNER, M. R.; LOWRY, G. V.; ALVAREZ, P.; DIONYSIOU, D.; BISWAS, P. Assessing the risks of manufactured nanomaterials. **Environ Sci Technol**, v. 40, n. 14, p. 4336-45, Jul 15 2006.

ZHANG, X. D.; WU, D.; SHEN, X.; LIU, P. X.; YANG, N.; ZHAO, B. *et al.* Size-dependent in vivo toxicity of PEG-coated gold nanoparticles. **Int J Nanomedicine**, v. 6, p. 2071-81, 2011.

ZHANG, Z.; ROSS, R. D.; ROEDER, R. K. Preparation of functionalized gold nanoparticles as a targeted X-ray contrast agent for damaged bone tissue. **Nanoscale**, v. 2, n. 4, p. 582-6, Apr 2010.