



UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
JÉSSICA DA SILVA ABEL

**INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO
ASSOCIADA A CARNITINA SOBRE PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS E
BIOQUÍMICOS EM GORDURA DE ANIMAIS SUBMETIDOS A OBESIDADE**

JÉSSICA DA SILVA ABEL

**INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO
ASSOCIADA A CARNITINA SOBRE PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS E
BIOQUÍMICOS EM GORDURA DE ANIMAIS SUBMETIDOS A OBESIDADE**

LINHA DE PESQUISA: Neurociências

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
da Saúde para obtenção do título de
Mestre (a) em Ciências da Saúde.

Orientador (a): Profa. Gislaine Tezza Rezin Dr.

Tubarão

2022

A12 Abel, Jéssica da Silva, 2000 -

Investigação dos efeitos das nanopartículas de ouro associada a carnitina sobre parâmetros inflamatórios e bioquímicos em gordura de animais submetidos a obesidade / Jéssica da Silva Abel. – 2022. 74 f. : il. color.; 30 cm

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Sul de Santa Catarina, Pós-graduação em Ciências da Saúde.

Orientação: Profª. Drª. Gislaine Tezza Rezin

1. Obesidade. 2. Estresse oxidativo. 3. Nanopartículas de Ouro. 4. Carnitina. I. Rezin, Gislaine Tezza. II. Universidade do Sul de Santa Catarina. III. Título.

CDD (21. ed.) 616.398

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - MESTRADO

Título da Dissertação

Investigação dos efeitos das nanopartículas de ouro associada a carnitina sobre parâmetros inflamatórios e bioquímicos em gordura de animais submetidos a obesidade

JÉSSICA DA SILVA ABEL
AUTOR

Aprovada pela Banca Avaliadora de Defesa da Dissertação em 29 de julho de 2022.

Doutora Gislaire Tezza Rezin (Orientador) *Gislaire Tezza Rezin*

Doutor Marcos Marques da Silva Paula (Avaliador externo - UFAM) - *presente por videoconferência*

Doutora Josiane Somariva Prophiro (Avaliador interno) *Josiane S. Prophiro*

Daniel F. Martins

Professor Doutor Daniel Fernandes Martins

**COORDENADOR ADJUNTO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNISUL**

Dedico a todas as pessoas incentivadoras
da pesquisa científica no Brasil.

AGRADECIMENTOS

Meu agradecimento inicial vai a Deus, por ter me dado saúde e esperança durante toda minha trajetória acadêmica.

Em especial agradeço também toda minha família por acreditarem em mim e serem meus incentivadores.

Agradeço imensamente todos meus colegas do laboratório pela ajuda prestada que tornou possível a realização do trabalho, especialmente a minha orientadora Gislaine, que durante esse tempo esteve presente em cada momento.

Não poderia deixar de agradecer a Universidade do Extremo Sul Catarinense e parceiros que contribuíram com a evolução do projeto.

E por fim agradeço a fonte financiadora pois o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES).

RESUMO

Introdução: A obesidade é uma doença caracterizada pelo excesso de gordura corporal, que desencadeia inflamação e estresse oxidativo, diante disso, se torna necessário a busca por terapias visando a diminuição dessas alterações. Diante disso, a nanotecnologia despertou interesse por ser promissora em tratamentos de doenças inflamatórias e com estresse oxidativo. Dentre os nanomateriais, as nanopartículas de ouro (AuNPs) são utilizadas em pesquisas como anti-inflamatória e antioxidante. Além disso, a carnitina também pode contribuir no tratamento da obesidade, uma vez que atua translocando ácidos graxos de cadeia longa do citoplasma para mitocôndria, facilitando a oxidação destes. **Objetivo:** Investigar os efeitos das AuNPs associada a carnitina sobre parâmetros inflamatórios e bioquímicos em gordura de animais submetidos a obesidade induzida por dieta. **Metodologia:** AuNPs foram sintetizadas para obter-se nanopartículas esféricas com tamanho médio de 20nm e associadas à carnitina. A caracterização foi realizada por espectroscopia de UV-vis, diâmetro da nanopartícula e análise do potencial zeta. Para os ensaios *in vivo*, camundongos Swiss machos receberam dieta normolipídica (grupo controle) ou dieta hiperlipídica (grupo obeso) por 10 semanas. Na sexta semana, os grupos foram divididos para o tratamento diário com salina ou AuNPs (70ug/Kg) ou carnitina (500mg/Kg) ou AuNPs associadas a carnitina. O peso corporal foi acompanhado semanalmente. Posteriormente, os animais foram mortos e a gordura mesentérica removida, pesada e utilizada na avaliação inflamatória e estresse oxidativo. **Resultados:** Os animais do grupo obeso atingiram pesos com significância estatística devido a alimentação hiperlipídica. Foi observado um aumento em IL-6 e IL-1 β no grupo não obesos tratados com AuNPs+carnitina. No entanto, não foram observadas diferenças significativas relevantes em IL-6, IL-1 β e IL-10 nos demais grupos. Com relação aos parâmetros oxidativos, os resultados sugerem a produção de dano oxidativo nos animais obesos, com ou em tratamento, sendo que o tratamento com AuNPs+carnitina foi mais expressivo em alguns parâmetros, incluindo no grupo de animais não obesos. **Conclusão:** A associação de AuNPs e carnitina gerou efeitos negativos no grupo sem obesidade e não reverteu as alterações causadas pela obesidade, acredita-se que a associação dessas moléculas em organismo saudável gere estresse e danos.

Palavras chaves: Obesidade. Nanopartícula de ouro. Carnitina. Inflamação. Dano oxidativo.

Descritores: Obesidade. Nanotecnologia. Carnitina. Inflamação. Dano oxidativo.

ABSTRACT

Introduction: Obesity is a disease characterized by excess body fat, which triggers inflammation and oxidative stress, thus, it is necessary to search for therapies aimed at these changes. Therefore, nanotechnology aroused interest because it is promising in treatments of inflammatory diseases and oxidative stress. Among nanomaterials, such as gold nanoparticles (AuNPs) are used in research as anti-inflammatory and antioxidant. In addition, carnitine can also contribute to the treatment of obesity, since it acts by translocating long-chain fatty acids from the cytoplasm to mitochondria, facilitating their oxidation. **Objective:** To investigate the effects of AuNPs associated with carnitine on inflammatory and biochemical parameters in fat of animals submitted to diet-induced obesity. **Methodology:** AuNPs were synthesized to obtain spherical nanoparticles with an average size of 20nm and associated with carnitine. The characterization was performed by UV-vis spectroscopy, nanoparticle diameter and zeta potential analysis. For the in vivo assays, Swiss male mice received dietary normolipid (control group) or high-fat dietary (obese group) for 10 weeks. On Friday, the groups were divided for daily treatment with saline or AuNPs (70ug/Kg) or carnitine (500mg/Kg) or AuNPs associated with carnitine. The weight cord was monitored weekly. Subsequently, the animals were killed and the mesenteric fat removed, weighed and used in inflammatory evaluation and oxidative stress. **Results:** The animals of the obese group reached weights with statistical significance due to high-fat diet. An increase was observed in IL-6 and IL-1 β in the non-obese group treated with AuNPs+carnitine. However, no significant differences were observed in IL-6, IL-1 β and IL-10 in the other groups. Regarding oxidative parameters, the results suggest the production of oxidative damage in obese animals, with or under treatment, and treatment with AuNPs+carnitine was more expressive in some parameters, including in the group of non-obese animals. **Conclusion:** The association of AuNPs and carnitine generated negative effects in the group without obesity and did not reverse the changes caused by obesity, it is believed that the association of these molecules in a healthy organism generates stress and damage.

Key words: Obesity. Gold nanoparticle. Carnitine. Inflammation. Oxidative damage.

LISTAS

Lista de abreviaturas

OMS – Organização Mundial da Saúde

DNA - Ácido desoxirribonucleico (do inglês *Deoxyribonucleic acid*)

IMC – Índice de massa corporal

EROs – Espécie reativa de oxigênio

AuNPs – Nanopartículas de ouro

SNC – Sistema nervoso central

cm – centímetros

TAB – Tecido adiposo branco

ATP – Adenosina trifosfato

LRb – Receptores para leptina hipotalâmicos de isoforma longa (do inglês *Long Isoform Hypothalamic Leptin Receptors*)

TLRs – Receptores Toll-like (do inglês *Toll-like receptors*)

SOD – Superóxido dismutase

CAT – Catalase

GSH – Glutathione

DIO – Obesidade induzida por dieta

mtDNA – DNA mitocondrial

SC – Santa Catarina

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

IL-1 β – Interleucina 1 β

IL-10 – Interleucina 10

IL-6 – Interleucina 6

TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa (do inglês *Tumor necrosis factor alpha*)

ERO – Espécies reativas de oxigênio

CPT1 – Carnitina Palmitoiltransferase 1

CPT2 – Carnitina Palmitoiltransferase 2

CAC – Carregador de carnitina

ACS – Acetil-CoA sintase

HCL – ácido clorídrico

HNO₃ – ácido nítrico

ELISA – ensaio imunoenzimático (*do inglês Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

Lista de figuras

Figura 1 - Consequência geradas pelo excesso de nutrientes consumidos	23
Figura 2 - Mecanismo de ação da carnitina na mitocôndria	28
Figura 3 - Desenho experimental	33

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1 REFERENCIAL TEÓRICO	20
1.1.1 Obesidade	20
2. OBJETIVOS	30
2.1 OBJETIVO GERAL.....	30
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
3. MÉTODOS	31
3.1 TIPO DE ESTUDO	31
3.2 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS.....	31
3.3 ANIMAIS.....	31
3.5 DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	32
3.6 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA	36
4. ARTIGO	37
5. REFERÊNCIAS	62
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	71
7. REFERÊNCIAS	72
ANEXO A- Parecer Aprovação do Comissão de Ética no Uso de Animais	80

1. INTRODUÇÃO

A obesidade é uma doença crônica não transmissível que tem crescido de forma alarmante nos últimos anos, sendo considerada pela organização mundial de saúde uma epidemia¹. Esta doença é multifatorial e está relacionada ao comportamento alimentar inadequado, estilo de vida, fatores genéticos e ambientais¹.

A obesidade é caracterizada por um acúmulo anormal de gordura no tecido adiposo de forma que pode comprometer a saúde do indivíduo²⁻⁴. Deste modo, distúrbios hormonais, como a resistência a leptina, que atua no controle da saciedade, e a insulina, que é responsável pelo metabolismo de glicose, fazem parte da fisiopatologia da obesidade⁵. Além disso, o acúmulo de gordura no tecido adiposo resulta em hiperplasia e hipertrofia de adipócitos, e por consequência hipóxia⁶, desencadeando o processo inflamatório. Sendo assim, a obesidade é considerada uma doença inflamatória de baixo grau. Além do processo inflamatório, encontra-se também estresse oxidativo que pode ser causa ou consequência do processo inflamatório envolvido na obesidade⁷. O processo inflamatório e estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e danos em Ácido desoxirribonucleico (DNA) podem comprometer a vitalidade celular^{7, 8}.

Embora a busca pelo entendimento da fisiopatologia e pelo tratamento da obesidade seja grande, ainda assim necessita-se de mais estudos sobre abordagens terapêuticas para esta finalidade. O mais recomendado para pacientes com obesidade é aderir a uma vida saudável, com alimentação equilibrada e exercícios físicos⁹. Embora existam medicamentos para tratar esta doença, os mesmos apresentam efeitos colaterais importantes¹⁰. Vale destacar que muito dos efeitos colaterais dos medicamentos ocorre por eles não serem seletivos, portanto, agem em todo o organismo após administrado sistemicamente¹⁰. Sendo assim, é interessante uma busca na ciência por novas estratégias farmacológicas para o tratamento da obesidade com foco no processo inflamatório presente em indivíduos obesos e visando qualidade de vida e longevidade do indivíduo¹¹.

Atualmente, a pesquisa de novas terapias já vem sendo estudada, destacando a nanotecnologia como uma área de aplicação promissora, por ser altamente interdisciplinar e tem uma ampla gama de aplicações inclusive, na bioquímica e biotecnologia^{12, 13}. A utilização biomédica desses materiais tem crescido muito devido

ao baixo custo e versatilidade dessas moléculas. A nanotecnologia pode ser utilizadas para fins de tratamento e diagnósticos¹⁴.

A nanotecnologia contém materiais com ações anti-inflamatórias, essa tecnologia tem uma ampla gama de utilizações nas mais diversas áreas. A utilização biomédica desses materiais tem crescido muito, devido a fácil manipulação e versatilidade dessas moléculas^{14,15}.

Dentro dos nanomateriais se tem a nanopartícula de ouro (AuNPs), que apresenta ação anti-inflamatória e antioxidante¹⁶. As AuNPs também são reconhecidas por sua superfície apresentar características que seja possível associar alguma molécula, como grupamentos tióis funcionando como carreadora de moléculas com ação terapêutica no organismo¹⁷. Além disso, a AuNPs é a principal nanopartícula utilizada no campo biomédico, por sua vasta utilização para diversos objetivos como, campo do diagnóstico e no tratamento em doenças com fisiopatologia associada a inflamação, e pela possibilidade de associação a outros materiais em sua superfície¹⁸.

A carnitina é uma molécula com alto potencial de ligação as nanopartículas de ouro¹⁹, é encontrada em alimentos de origem animal, mas também pode ser sintetizada endogenamente. A carnitina é responsável pelo transporte de ácidos graxos de cadeia longa do citosol para a mitocôndria²⁰. Além disso, já demonstrou propriedades antioxidantes, dessa forma agindo na prevenção de danos celular²¹.

Portanto, devido ao grande número de indivíduos com obesidade, e considerando as consequências e riscos aliados a essa doença, se torna de extrema importância a busca por novas terapias visando melhorar o quadro clínico desses pacientes. De forma que a inflamação e estresse oxidativo seja reduzido e consequentemente trazendo uma melhor qualidade de vida aos indivíduos com obesidade.

1.1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1.1 Obesidade

A obesidade é uma doença multifatorial desencadeada principalmente pelo alto consumo de nutrientes e, muitas vezes, diminuição do gasto energético. O principal

fator relacionado ao desenvolvimento da obesidade é o aumento de dietas com alto consumo de açúcar e gordura saturada provindas principalmente de alimentos ultra processados e *fast food*¹. Isso faz com que o organismo armazene energia em forma de gordura, resultando em um aumento do tecido adiposo. Esse acúmulo de gordura é armazenado principalmente na região abdominal, gerando alterações bioquímicas tais como elevados níveis de glicose, triglicerídeos e colesterol. Tais alterações são fatores de risco para doenças cardiovasculares e diabetes, afetando a qualidade de vida dos indivíduos com obesidade^{1,22}.

Em 2016 a obesidade afetou quase 650 milhões de indivíduos em todo o mundo¹. A prevalência mundial de obesidade quase triplicou de 1975 a 2016¹. Em 2019, 38 milhões de crianças de até 5 anos foram classificadas com sobrepeso ou obesidade¹. No Brasil a prevalência de obesidade em adultos cresceu 67,8% de 2006 a 2018. No mesmo período notou-se que a prevalência de obesidade estava em indivíduos de 25 a 34 anos com baixa escolaridade²³. Dados publicados em 2019 demonstram que 61,7% da população brasileira apresentava excesso de peso e 1 a cada 4 brasileiros obesidade²⁴. As projeções futuras propostas pela organização mundial da saúde (OMS) prevê que em 2025, cerca de 2,3 bilhões de adultos terão sobrepeso, 700 milhões terão obesidade e 75 milhões de crianças estarão com excesso de peso ou com alguma classificação de obesidade¹.

Os dados epidemiológicos podem ser alterados pelo método de diagnóstico escolhido, sendo o método mais comum o índice de massa corporal (IMC), que consiste apenas na divisão do peso pela altura ao quadrado. O IMC é a forma mais rápida e simples de fazer a avaliação da composição corporal, por esse motivo é muito utilizado¹. Esse método pode falhar em indivíduos com alto índice de massa muscular, indicando um falso negativo²⁵. O IMC classifica o indivíduo em abaixo do peso, peso normal, sobrepeso, ou então em obesidade grau 1, 2 e 3. Além deste método é utilizado a medida de circunferência abdominal, onde medidas maiores que 102 cm para homens e 88 cm para mulheres são considerados incomum, e geram preocupações com a saúde do indivíduo. Apesar desses métodos serem os mais utilizados pelo baixo custo e facilidade de execução, não é o mais indicado, pois não considera o estado físico da pessoa e diferenças entre massa magra e gorda¹.

Alternativas com custo mais acessível são as comumente utilizadas para diagnosticar a obesidade, porém existem diversas metodologias que podem diferenciar peso total de gordura corporal, entre elas, as medidas das pregas cutâneas

e análise de bioimpedância²⁶. Metodologias com utilização de imagem, tais como ultrassonografia, ressonância magnética e tomografia computadorizada apresentam maior segurança e eficácia comparados aos outros métodos, porém o alto custo limita o uso dessas técnicas na prática clínica²⁵.

Desta forma para estudos pré-clínicos é utilizado camundongos da linhagem Swiss machos, os mesmos demonstram uma resposta melhor à dieta para obtenção da obesidade²⁷. A indução da obesidade geralmente é através de alimentação, e a metodologia melhor padronizada é pela ração hiperlipídica a qual é produzida com o controle de calorias²⁸.

1.1.1.1 Fisiopatologia da obesidade

O acúmulo de gordura é consequência do excesso de energia proveniente do desequilíbrio entre o alto consumo de calorias e baixo gasto energético, esse acúmulo acontece no tecido adiposo. O tecido adiposo branco (TAB) responsável por armazenar triacilgliceróis, tem a capacidade de secretar substâncias denominadas adipocinas, que modulam o metabolismo energético e níveis hormonais²⁹.

Hormônios como leptina, grelina e insulina sofrem alterações negativas com o acúmulo de gordura no TAB. Leptina é um hormônio secretado principalmente pelo TAB, que atua em processos fisiológicos, incluindo controle de apetite, peso corporal, entre outras funções neuroendócrinas e controle da glicemia³⁰. Este é um hormônio regulador que exerce sua função inibindo a ingestão de alimentos e aumentando o gasto energético^{31,32}. Os efeitos da leptina são mediados pela sua ação em receptores hipotalâmicos no sistema nervoso central (SNC)^{33,34}. A leptina se liga a receptores para leptina hipotalâmicos de isoforma longa (LRb) que media a sinalização intracelular, e transmite sinalizações conforme massa do tecido adiposo e depósito energético existente, suprimindo a ingestão alimentar e contribuindo para o gasto energético, além disso colabora periféricamente com redução na síntese e secreção de insulina^{35,36}. Em indivíduos com obesidade encontra-se uma desregulação positiva na secreção de leptina sendo possível detecção pelo soro³⁷, o excesso de secreção de leptina em um indivíduo desenvolve resistência a esse hormônio, prejudicando a sinalização da leptina e consequentemente saciedade do indivíduo³⁸. Além disso, leptina em excesso tem papel importante na inflamação, estudos sobre a Leptina, demonstraram a capacidade de estimular produção de IL-6 e TNF- α no tecido adiposo

o que estimula inflamação devido a IL-6, e morte celular por apoptose devido ao TNF- α ³⁹.

Outro hormônio afetado pela obesidade é a grelina secretado pelo estômago em momentos de jejum gerando a sensação de fome e induzindo a ingestão de alimentos, por esse motivo a grelina é conhecida como o hormônio da fome⁴⁰. Já foi demonstrado que esse neurônio está dessensibilizado na obesidade alterando negativamente sua ação no controle da fome sendo detectado no soro dos pacientes⁴¹. Além da sua função na regulação da fome, a grelina tem muitas outras funções, como seu papel na homeostase da glicose, a partir da inibição da ação da insulina e a redução do gasto energético⁴².

Insulina é um hormônio secretado pelas células betas pancreáticas, com a função de sinalizar a entrada da glicose nas células permitindo sua utilização como fonte energética⁴³. Em obesos é comum encontrar a resistência à insulina, fato que pode ser explicado pelo acúmulo de lipídeos e processo inflamatório⁴⁴. A hiperglicemia e hiperlipidemia alteram vias inflamatórias e, por consequência, irá comprometer a captura da glicose para dentro da célula, e a insulina, irá se dedicar na realização da sua função no receptor, até que gera a resistência à insulina e/ou danos na célula secretora de insulina^{44,45}. Embora no início de uma resistência à insulina há um aumento da função das células beta e hiperinsulinemia como sistema de recompensa, acaba ocorrendo dano dessas células devido ao aumento da sua função e, conseqüentemente, irá agravar o quadro de resistência à insulina⁴⁵.

1.1.1.1.1 Inflamação

O desequilíbrio hormonal favorece o aumento no consumo de nutrientes. A grande ingestão calórica, pode desenvolver hipertrofia e hiperplasia de adipócitos, por servir como depósito de gordura, causando alterações no TAB⁴⁶. Com a expansão do TAB, ocorre a compressão dos vasos sanguíneos, comprometendo o fornecimento adequado de oxigênio, causando hipóxia no tecido⁴⁷. Devido a hipóxia, ocorre o recrutamento de macrófagos iniciando o processo inflamatório, devido a produção excessiva de mediadores pró-inflamatórios⁴⁸. Além disso, a hiperglicemia e hiperlipidemia contribuem para a ativação das vias inflamatórias através de receptores *Toll-like* (TLR)^{5,48,49}. Inflamação crônica de baixo grau localizada no TAB,

desenvolvida na obesidade, se propaga a uma inflamação sistêmica e contribui para o início e progressão das doenças metabólicas associadas a obesidade^{38, 50,51}.

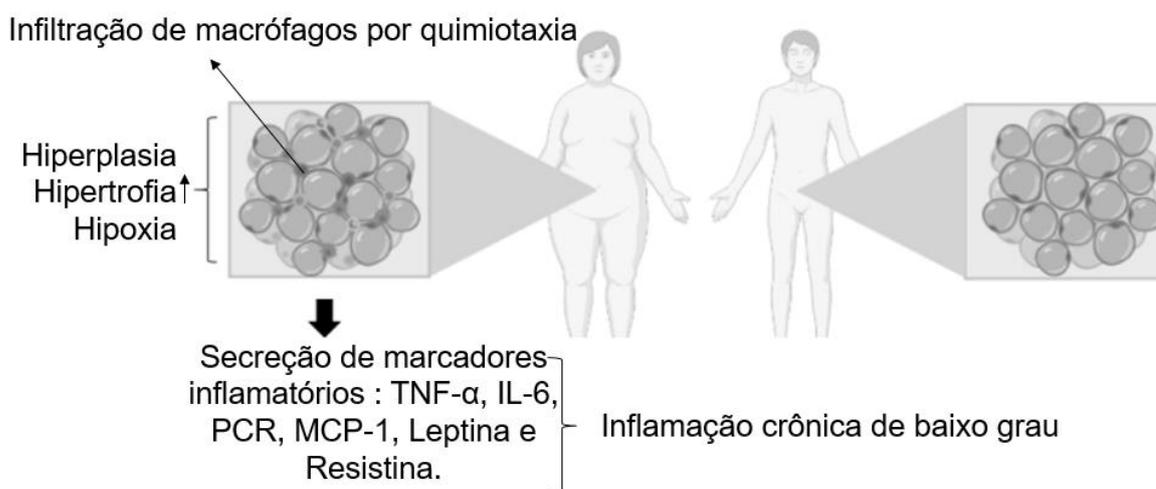


Figura 1. Abel, J. S et. al 2022. Consequência geradas pelo excesso de nutrientes consumidos. Com excesso de nutrientes ocorre a hiperplasia, hipertrofia e como consequência hipoxia e dessa forma desencadeia reações inflamatórias.

1.1.1.1.1 Estresse oxidativo

Com o aumento do processo inflamatório e desregulação metabólica se tem a sobrecarga na atividade mitocondrial, contribuindo com o aumento também da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). O aumento de EROs leva ao estresse oxidativo, que é caracterizado pela dissipação efetiva do gradiente de prótons e pelo desequilíbrio entre produção de EROs e defesa pela atividade de antioxidantes^{52,53}. EROs pode ser produzido por diversas vias, mas a fonte principal é a cadeia respiratória por possuir um maior número de centros redox⁵⁴.

O estresse oxidativo pode trazer danos a célula como oxidação de proteínas, lipídeos, e ácido desoxirribonucleico (DNA), acarretando em perdas de algumas funções biológicas⁵⁵. O estresse oxidativo pode levar a disfunção mitocondrial, que desta forma reduz a respiração mitocondrial de O₂, comprometendo a produção de adenosina trifosfato (ATP), o que contribuindo para o aumento na emissão de ERO mitocondrial⁵⁶.

Estudos relatam que nesses indivíduos com a produção exacerbada de ERO e ocorrência de disfunção mitocondrial, desencadeia primeiramente dano em DNA mitocondrial (mtDNA), DNA nuclear, danos às células ou até mesmo a morte celular⁵⁷.

Com o dano mitocondrial a mitocôndria irá liberar citocromo c no citoplasma, responsável por iniciar a via de sinalização da apoptose⁵⁸. Na apoptose é encontrado diminuição de Bcl-2 (anti-apoptótico) e aumentado significativamente de Bax (pró-apoptótico)⁵⁹.

O dano oxidativo pode ser causa ou consequência de uma disfunção mitocondrial⁶⁰. As mitocôndrias desempenham um papel central na homeostase energética, função primária das mitocôndrias é a de produzir energia na forma de ATP a partir de substratos provenientes da alimentação (carboidratos, gorduras e proteínas)⁶¹. O dano oxidativo pode levar a morte celular por apoptose. A apoptose em condições fisiológicas desempenham um papel importante⁶², no entanto apoptose em excesso tem um papel negativo^{63,64}. Os tratamentos disponíveis atualmente não são suficientes para atenuar todo o processo inflamatório e dano oxidativo descrito anteriormente.

1.1.1.2 Dificuldade no tratamento para obesidade

O tratamento da obesidade não tem a perda de peso como objetivo principal, mas sim o reestabelecimento homeostático do organismo a partir do reequilíbrio energético. Com isso, a primeira linha de tratamento indicada para obesidade, é a mudança no estilo de vida, o equilíbrio entre o consumo e gasto de calorias, ou seja, a reeducação alimentar e o gasto energético por meio de exercício físico^{65,66}.

Entretanto, nem sempre a mudança do estilo de vida isoladamente é eficaz, por existirem inúmeros fatores na obesidade que contribuam para o insucesso dessa opção terapêutica^{65,66}. Por isso, comumente, se associam opções farmacológicas ao tratamento, com o objetivo de otimizar o processo. Contudo, as terapias farmacológicas disponíveis atualmente ainda são limitadas, além disso os medicamentos disponíveis para o tratamento de pacientes com obesidade ainda são muito questionados, pois são frequentemente relacionados a eventos adversos importantes e não é recomendado ser utilizadas por um longo período⁶⁷. Muito dos efeitos colaterais dos medicamentos ocorre por eles não serem seletivos, e terem baixa biodisponibilidade, agindo em todo o organismo após administrado sistemicamente¹⁰. Dessa forma, o cenário atual reflete a necessidade de novas

opções terapêuticas mais seletivas, seguras e efetivas para o tratamento da obesidade.

1.1.1 Nanotecnologia

A nanotecnologia é considerada uma área promissora e em crescimento, que abrange muitas áreas da ciência e aplicações tecnológicas. Essa tecnologia envolve a manipulação de materiais em escala atômica que tem o objetivo de criar novas estruturas, dispositivos e materiais¹⁵. A nanotecnologia contém materiais com tamanhos variando de 0,1 a 100 nm, portanto, devido ao seu pequeno tamanho, é inerente a esses materiais diferentes propriedades como: reatividade química, condutância elétrica, magnetismo, efeitos ópticos e resistência física⁶⁸. Essa tecnologia é altamente interdisciplinar e tem uma ampla gama de aplicações, muito utilizada na ciência biomédica envolvendo a síntese e entrega de fármacos, terapia genética, entre outras. A partir do final do século XX, a utilização da nanotecnologia aumentou significativamente, tanto na indústria cosmética quanto na pesquisa para área da saúde, com isso também o aprimoramento e descoberta de novos nanomateriais⁶⁹.

Os nanomateriais são classificados em orgânicos e inorgânicos. Os orgânicos são os componentes celulares e vírus, e inorgânicos são aqueles baseados em óxidos metálicos e metais¹³. Nas últimas décadas, de todas as nanoestruturas existentes, as nanopartículas esféricas inorgânicas cujas estruturas possui propriedades funcionais e biológicas devido ao seu tamanho, tem despertado interesse de diferentes grupos de pesquisa^{28, 70}. Assim, destaca-se as nanopartículas metálicas, cuja principal função é entrega de fármaco⁷¹. Entre vários metais, as nanopartículas de prata e ouro são de primordial circulação, podendo controlar a entrega de substâncias biologicamente ativas e sendo utilizado principalmente em terapias para doenças inflamatórias⁶⁸. Neste contexto, as nanopartículas metálicas podem melhorar a biodisponibilidade de fármacos potencializando os efeitos terapêuticos⁷².

1.1.1.1 Nanopartículas de ouro

As AuNPs são amplamente conhecidas por fazer entrega de fármacos no tecido ou célula alvo e por suas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes⁷³, bem como

ópticas, eletrônicas, redox e catalítica⁷⁴. Devido a sua escala nanométrica a penetração em membranas celulares é facilitada, podendo ser utilizada em uma gama de aplicações biomédicas⁷⁵. Ainda, as AuNPs podem ultrapassar a barreira hematoencefálica (BHE) sem a necessidade de estímulos externos, fato que contribui para biodisponibilidade e ação no SNC⁷⁶. Outra característica interessante das AuNPs se dá pelo fato de se conjugarem facilmente a moléculas, como as com grupamentos tióis e aminas. Dessa forma, teria a possibilidade de funcionalizar e direcionar fármacos para tecidos alvos⁷⁷, aumentando a efetividade do tratamento, além das propriedades deste nanomaterial, como anti-inflamatória e anti-oxidante⁷⁸.

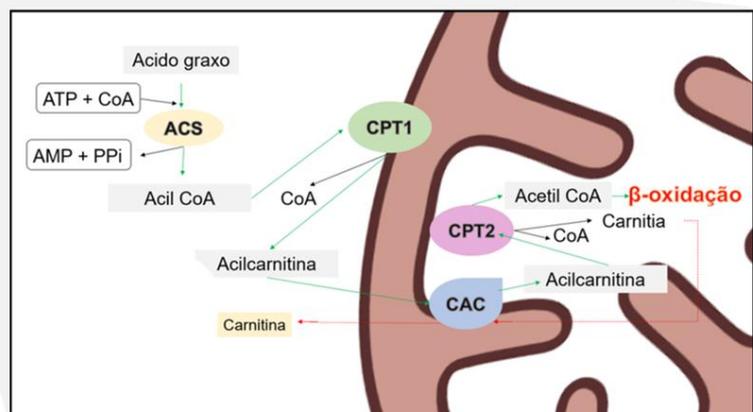
A ação anti-inflamatória relacionada as AuNPs foi atribuída as evidências da ligação extracelular deste nanomaterial com IL-1 β , evitando sua ligação aos receptores de membrana, inibindo assim a cascata de sinalização inflamatória por esta via⁷⁹. Além disso, a inibição da sinalização via IL-1 β suprime a via NF- κ B e dessa forma reduz a proliferação de citocinas pró-inflamatórias⁸⁰. Isso aconteceu no estudo de Khan e colaboradores⁸⁰, onde modelos experimentais de artrite reumatoide, e tratamento com AuNPs de 20nm por 20 dias, resultou em diminuição da inflamação, possivelmente pelo efeito da supressão de NF- κ B, Cox-2 e iNOS, reduzindo assim a produção de citocinas pró-inflamatórias.

Neste contexto, devido a ação antioxidante das AuNPs, pode haver diminuição de ERO e radicais livres, protegendo contra danos oxidativos^{81,82}. Além disso, as AuNPs já demonstraram ser eficazes na redução da neuroinflamação induzida por modelo de doença de Alzheimer, atuando na redução de macrófagos e micróglia ativada, e reduzindo também citocinas pró-inflamatórias circulantes⁸³. Em um estudo de Dos Santos e colaboradores⁸⁴, observou-se também que a terapia com nanopartículas de ouro foi capaz de reduzir a produção de citocinas pró-inflamatórias em modelo de inflamação pulmonar e, conseqüentemente, melhorando o estado clínico da doença⁸⁴. Com base nesses achados da literatura, sugere-se que mediadores anti-inflamatórios., nanopartículas com propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes, podem atuar como possíveis estratégias terapêuticas promissoras para o tratamento da obesidade, bem como associar todos esses benefícios com outras moléculas e direcionar para tecidos ou células alvos¹¹.

1.1.1 Carnitina

A carnitina é uma amina quaternária solúvel em água, considerada por alguns autores um aminoácido não proteico⁸⁵. A maior parte da carnitina encontrada no organismo é obtida pela alimentação a partir de produtos derivados de animais⁸⁶, mas também existe síntese endógena que ocorre, principalmente, nos rins e fígado⁸⁷. A principal função da carnitina é atuar na translocação de ácidos graxos de cadeia longa do citosol para a mitocôndria para que ocorra a β -oxidação⁸⁸. Esse processo é catalisado pelo sistema de transporte de carnitina⁸⁹. Sendo assim, o ácido graxo é convertido a acil-CoA a partir da acetil-CoA sintase (ACS), em seguida acetil-CoA sofre a ação da palmitoiltransferase 1 (CPT1), que converte acetil-CoA em acilcarnitina. O carregador de carnitina (CAC) transloca a acilcarnitina para a matriz mitocondrial desde que tenha carnitina livre intramitocondrial, e por fim palmitoiltransferase 2 (CPT2) converte acilcarnitina em acetil-CoA para ser usado na β -oxidação conforme figura 1^{90,91}.

Além disso, a carnitina também é essencial no efluxo de grupos acetil e acil para fora da mitocôndria, em casos que a oxidação ultrapasse a demanda de energia, e, nesse caso, sem a carnitina ocorreria o acúmulo destes grupos na matriz mitocondrial⁸⁵. Essa última função ganhou destaque com a descoberta que o acúmulo de grupos acetil e acil está associado ao desenvolvimento de resistência à insulina⁹². Além disso, devido ao aumento no metabolismo, estudos trazem uma melhora na tolerância a glicose ou sensibilidade a insulina a partir da suplementação de carnitina⁹³.



ATP – adenosina trifosfato
 CoA – Coenzima A
 CPT1 – Carnitina Palmitoiltransferase
 CPT2 – Carnitina Palmitoiltransferase
 CAC – Carregador de carnitina
 ACS – Acetil-CoA sintase

Figura 2. Mecanismo de ação da carnitina na mitocôndria. Adaptado de Cesare Indiveri 2011⁹⁰. (ATP – adenosina trifosfato, CoA – Coenzima A, CPT1 – Carnitina Palmitoiltransferase, CPT2 – Carnitina Palmitoiltransferase, CAC – Carregador de carnitina, ACS – Acetil-CoA sintase)

Além das funções da carnitina, ela também tem alto potencial para ligação com nanopartículas de ouro, devido a sua estrutura ser muito semelhante a peptídeos ¹⁹⁹⁴, despertando assim o interesse no estudo da associação de ambos. Portanto, se faz necessário a investigação dos efeitos da associação de AuNPs com carnitina, no processo inflamatório e estresse oxidativo desenvolvido na obesidade. Estudos destacam que a suplementação com carnitina pode ser potencialmente usada como antioxidante⁹⁵ dessa forma diminuindo estresse oxidativo, inibição apoptótica em órgãos⁵⁹, diminuição em processos inflamatórios e até melhora da função mitocondrial em função patológicas quando realizado a suplementação com carnitina⁹⁶.

Portanto, devido ao aumento de indivíduos com obesidade nos últimos anos, e considerando que esses números têm a tendência de crescer muito nos próximos anos, e as consequências e riscos aliados a essa doença, se torna de extrema importância a busca por novas terapias visando melhorar o quadro clínico desses pacientes. Visto que as principais e mais severas consequências da obesidade são desencadeadas pela inflamação e estresse oxidativo, novas abordagens terapêuticas devem priorizar a redução da inflamação e estresse oxidativo. Assim, novas abordagens terapêuticas devem priorizar a redução da inflamação e estresse oxidativo.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos das nanopartículas de ouro associada a carnitina sobre parâmetros inflamatórios e bioquímicos em gordura mesentérica de animais submetidos a obesidade.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar e caracterizar nanopartículas de ouro de 20nm;
- Associar nanopartículas de ouro a carnitina;
- Pesar semanalmente os camundongos;
- Pesar gordura mesentérica dos camundongos;
- Verificar os níveis de IL-6, IL-1 β e IL-10 na gordura mesentérica;
- Avaliar dano oxidativo a proteínas e lipídeos e níveis de nitrito/nitrato na gordura mesentérica;
- Quantificar a atividade da SOD e da CAT na gordura mesentérica;

3. MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDO

Se trata de um estudo pré-clínico com uso do modelo animal de obesidade induzido por dieta.

3.2 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

As rações foram obtidas da empresa PragSoluções Biociências – PragSoluções Comércio e Serviços Ltda, SP, Brasil. As nanopartículas de ouro foram produzidas a partir do ácido tetracloroáurico adquirido na Sigma-Aldrich, MO, EUA. A carnitina foi comprada na farmácia de manipulação Maria Rocha, SC, Brasil.

Para as análises inflamatórias e bioquímicas foram utilizados os seguintes reagentes: Fosfato de potássio, fosfato de sódio, ácido clorídrico, ácido sulfúrico, tampão de lavagem m, tampão de bloqueio, diluente, anticorpo de captura, anticorpo de detecção, fotorreagente, albumina bovina, hidróxido de sódio, carbonato de sódio, sulfato de cobre, tartarato de sódio e potássio, folin, cloreto de potássio, ácido tricloroacético, 1,1,3,3–tetrametoxipropano, ácido tiobarbitúrico, álcool etílico, acetato de etila, dinitrofenilhidazina, ácido aminocético, adrenalina, catalase, cloreto de sódio.

Em relação aos equipamentos, foram utilizados homogeneizador, freezer, geladeira, balança analítica, pHmetro, centrífuga, banho-maria, espectrofotômetro e sistema de condensação.

O procedimento experimental foi realizado na, UNISUL, Tubarão (SC), onde foram utilizados: pHmetro, balança analítica, banho maria, espectrofotômetro, centrífuga, homogeneizador e, o biotério. Com parceria do Laboratório de Fisiopatologia Experimental na UNESC.

3.3 ANIMAIS

Foram utilizados 96 camundongos da linhagem Swiss machos (*Mus musculus*) com 40 dias de idade, pesando inicialmente entre 30-40g. Os animais foram procedentes do biotério da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Foi disponibilizado aos camundongos, livre acesso à água e ração, e os mesmos foram

mantidos em ciclos de claro/escuro de 12 horas cada com temperatura de $23\pm 1^\circ\text{C}$. Os animais foram divididos em grupos com diferentes dietas e tratamento:

- Dieta padrão + Salina (grupo controle + salina) (n=12);
- Dieta padrão + AuNPs (grupo controle + AuNPs) (n=12);
- Dieta padrão + Carnitina (grupo controle + Carnitina) (n=12);
- Dieta padrão + AuNPs + Carnitina (grupo controle + AuNPs + Carnitina) (n=12);
- Dieta hiperlipídica + Salina (grupo obeso + salina) (n=12);
- Dieta hiperlipídica + AuNPs (grupo obeso + AuNPs) (n=12).
- Dieta hiperlipídica + Carnitina (grupo obeso + Carnitina) (n=12);
- Dieta hiperlipídica + AuNPs + Carnitina (grupo obeso + AuNPs + Carnitina) (n=12);

3.4 SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO

Nanopartículas de ouro com tamanhos médios de 20 nm foram sintetizadas, a partir de redução química do precursor metálico ácido tetracloroáurico (HAuCl_4) (Sigma-Aldrich, MO, EUA) com o agente redutor e estabilizante citrato de sódio (Nuclear, SP, Brasil). Inicialmente, 100 mL de ácido tetracloroáurico, foram transferidos para um balão de fundo redondo, a solução aquecida até 95°C e sob agitação. Solução de citrato de sódio, previamente preparada, foi então adicionada, e o sistema mantido à temperatura descrita, agitando durante 20 minutos⁹⁷. A solução adquiri a coloração correspondente ao tamanho.

A caracterização das nanopartículas será através do potencial zeta que é medido na temperatura ambiente, usando espalhamento dinâmico de luz (DLS) e espalhamento de luz eletroforético.

3.5 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Foi iniciado a indução de obesidade com alimentação hiperlipídica por 10 semanas, sendo 6 semanas sem tratamento e 4 semanas com tratamento. Ao final das 6 semanas foi iniciado o tratamento com nanopartículas de ouro de 20 nm com concentração de $70\mu\text{g}/\text{kg}$ ²⁸ associado ou não a $500\text{mg}/\text{kg}$ ⁹⁸ de carnitina, por 4 semanas, 1 vez ao dia. Ao final das 4 semanas foi realizado a morte dos animais para retirada da gordura mesentérica (Figura 2).

Figura 2 – Desenho experimental

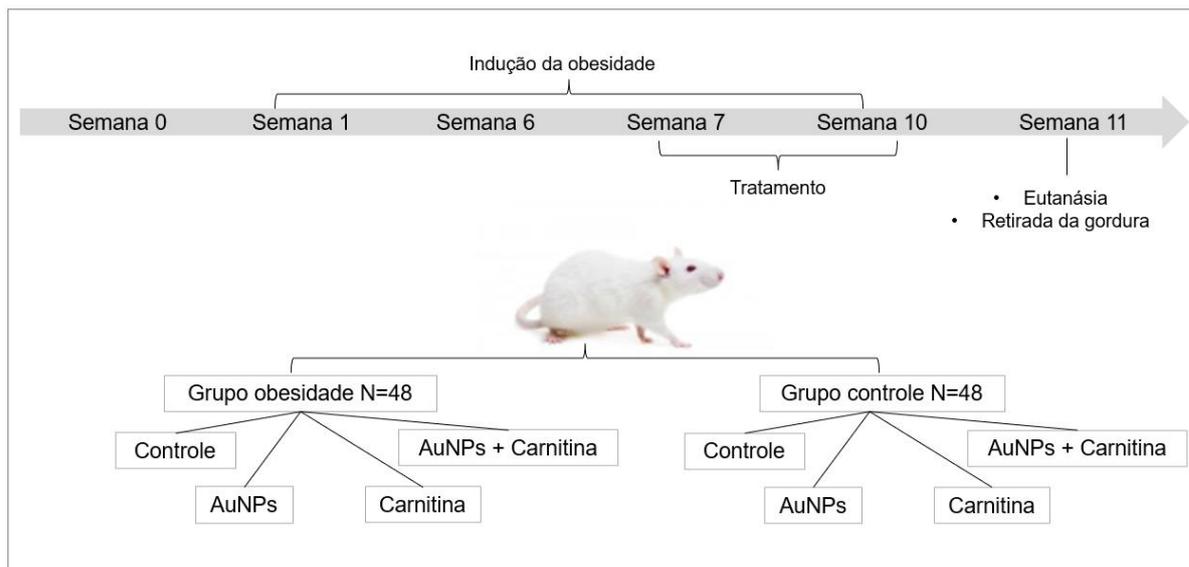


Figura 3: Na semana 1 foi iniciado a indução da obesidade com ração hiperlipídica que continuou até a 10ª semana, na 7ª, 8ª, 9ª e 10ª semana foi associado os tratamentos. Ao final na 11ª realizado eutanásia e retirada da gordura mesentérica.

3.5 ENSAIOS/TESTES/TÉCNICAS

3.5.1 Conjugação de carnitina a nanopartícula de ouro

A conjugação das nanopartículas de ouro e carnitina foi realizado adicionando a carnitina na AuNPs, essa mistura ficou em agitação por 1 hora em temperatura ambiente, para que ocorra a reação. A concentração de carnitina foi de 500mg/ml em AuNPs⁹⁵, a qual foi a concentração mínima testada previamente capaz de ligar a nanopartícula.

3.5.2 Tratamento de nanopartícula ouro associado a carnitina e pesagem dos animais

Os animais dos grupos Carnitina, AuNPS e AuNPs associada a carnitina, receberam após a indução da obesidade o tratamento por 4 semanas, uma vez ao dia, via intraperitoneal. A concentração de AuNPs+Carnitina foi 0,500mg/ml, o grupo AuNPs recebeu 70ug/ml de AuNPs, e o grupo carnitina recebeu 500mg/kg de carnitina

diluído em salina. Já os grupos controles com ou sem obesidade foi administrado apenas salina no mesmo tempo que o grupo tratamento.

Semanalmente foi realizado a pesagem de todos os animais do experimento, para que fosse possível acompanhar a evolução de peso dos mesmos.

3.5.3 Remoção do tecido e pesagem

Vinte e quatro horas após a última administração, os animais foram mortos a cavidade abdominal aberta e retirado o tecido adiposo da região mesentérica pesados em balança de alta precisão. Após, o tecido removido parte da amostra foi encaminhado para quantificação de AuNPs. O restante da estrutura também foi rapidamente isolado para realização das análises de parâmetros inflamatórios e bioquímicos.

3.5.6 Análise inflamatória

Os níveis de IL-6, L-1 β e IL-10 foram determinados na gordura mesentérica dos animais pela técnica de *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) em leitor de microplacas com a utilização de kit comercial, seguindo as recomendações do fabricante. Os resultados foram expressos em picogramas por mililitro (pg/ml). Todas as técnicas foram comparadas as proteínas determinadas pelo método de Lowry et al³¹, e a albumina sérica bovina foi utilizada como padrão

3.5.7 Análise de dano oxidativo

As concentrações de nitrito/nitrato foram avaliadas espectrofotometricamente na gordura mesenterica usando reagentes griess (1% sulfamilamida em ácido fosfórico de 5% e 0,1% N-1-naftilethylenediamine dihydrochloride em H₂O bi-destilado) e vândio (III). Uma curva padrão foi executada simultaneamente com cada conjunto de amostras, e a densidade óptica a 550 nm (OD550) foi medida usando um leitor de microplacção ELISA³²

O dano oxidativo em lipídios foi avaliado em gordura mesentérica dos animais através da formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS),

conforme anteriormente descrito por Draper e Hadley¹⁰⁰. A formação de TBARS durante uma reação ácido-aquecimento é amplamente adotada como um método sensível para a medição da peroxidação lipídica. Nesta técnica, as amostras serão misturadas com 1 ml de ácido tricloroacético 10% e 1 ml de ácido tiobarbitúrico 0,67%. Posteriormente, aquecidas em banho de água fervente (100°C) durante 30 min. Os equivalentes de malondialdeído determinados pela absorvância em 532 nm.

O dano oxidativo a proteínas foi realizado em gordura mesentérica dos animais, e a avaliação através da determinação de grupamentos carbonilas em proteínas oxidadas, com base na reação com dinitrofenilhidrazina, conforme método descrito por Levine e colaboradores¹⁰¹. Nesta técnica as proteínas são precipitadas por adição de ácido tricloroacético a 20% e dissolvidas em dinitrofenilhidrazina. A absorvância é avaliada em 370 nm e os resultados expressos em nmol de proteínas carboniladas por mg de proteína (nmol/mg proteína). Todas as técnicas foram comparadas as proteínas determinadas pelo método de Lowry et al⁹⁹, e a albumina sérica bovina utilizada como padrão.

3.5.8 Análise de defesa antioxidante

A atividade da enzima antioxidante SOD foi determinada em gordura mesentérica dos animais pela inibição da auto-oxidação da adrenalina medida espectrofotometricamente, conforme descrito por Bannister e Calabrese¹⁰². A técnica baseia-se na inibição da reação do radical O_2 com adrenalina, composto que se auto-oxida com variação de pH. A oxidação da adrenalina leva à formação de adrenocromo e a atividade da SOD foi determinada medindo-se a velocidade de formação do adrenocromo, determinada espectrofotometricamente a 480 nm, em um meio de reação contendo glicina-NaOH (50 mM em pH 10,2) e adrenalina 60 mM. Os resultados foram ser expressos em U/mg de proteína.

A atividade da enzima antioxidante CAT foi determinada em gordura mesentérica dos animais medindo-se a taxa de decaimento da absorvância do H_2O_2 em 240nm, conforme técnica descrita por Aebi¹⁰³. Nesta técnica, os tecidos são homogeneizados em tampão fosfato (pH 7,4) e centrifugados durante 10 min. Na sequência, a um meio de reação foi adicionado amostra e 1mL de substrato contendo

H₂O₂ e tampão fosfato. As absorvâncias iniciais e finais foram registradas em 1 e 6 min, respectivamente.

Todas as técnicas foram comparadas as proteínas determinadas pelo método de Lowry et al⁹⁹, e a albumina sérica bovina foi utilizada como padrão.

3.6 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

O presente projeto de pesquisa foi submetido à avaliação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Sul de Santa Catarina e aprovado com o protocolo 21.008.4.01.IV. A utilização dos animais seguiu os Princípios de Cuidados de Animais de Laboratório (*Principles of Laboratory Animal Care*, Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos da América, NIH, publicação número 80-23, revisada em 1996), assim como a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos (DBCA), publicada em 2013 pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises foram realizadas utilizando InStat Statistical Software (GraphPad, La Jolla, CA, EUA). As comparações entre os grupos experimentais foram realizadas utilizando o teste t de student e as comparações entre três grupos ou mais foram realizadas utilizando análise de variância (ANOVA) seguido pelo post hoc de Tukey. Os resultados foram apresentados em média ± desvio padrão e a significância estatística considerada para valores de $p < 0,05$.

4. ARTIGO

Investigação dos efeitos das nanopartículas de ouro associada a carnitina sobre parâmetros inflamatórios e bioquímicos em gordura de animais submetidos a obesidade

Jessica Abel¹

Laboratório de Neurobiologia de Processos Inflamatórios e Metabólicos,
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Sul de Santa
Catarina, Santa Catarina, Brasil;

2 Laboratório de Fisiofisiologia, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde,
Universidade do Extremo Sul Catarinense, Santa Catarina, Brasil;

3 Secretaria de Saúde, Sociedade Educacional de Joinville, Santa Catarina, Brasil.

RESUMO

Introdução: A obesidade é uma doença caracterizada pelo excesso de gordura corporal, que desencadeia inflamação e estresse oxidativo, diante disso, se torna necessário a busca por terapias visando a diminuição dessas alterações. Diante disso, a nanotecnologia despertou interesse por ser promissora em tratamentos de doenças inflamatórias e com estresse oxidativo. Dentre os nanomateriais, as nanopartículas de ouro (AuNPs) são utilizadas em pesquisas como anti-inflamatória e antioxidante. Além disso, a carnitina também pode contribuir no tratamento da obesidade, uma vez que atua translocando ácidos graxos de cadeia longa do citoplasma para mitocôndria, facilitando a oxidação destes. **Objetivo:** Investigar os efeitos das AuNPs associada a carnitina sobre parâmetros inflamatórios e bioquímicos em gordura de animais submetidos a obesidade induzida por dieta. **Metodologia:** AuNPs foram sintetizadas para obter-se nanopartículas esféricas com tamanho médio de 20nm e associadas à carnitina. A caracterização foi realizada por espectroscopia de UV-vis, diâmetro da nanopartícula e análise do potencial zeta. Para os ensaios *in vivo*, camundongos Swiss machos receberam dieta normolipídica (grupo controle) ou dieta hiperlipídica (grupo obeso) por 10 semanas. Na sexta semana, os grupos foram divididos para o tratamento diário com salina ou AuNPs (70ug/Kg) ou carnitina (500mg/Kg) ou AuNPs associadas a carnitina. O peso corporal foi acompanhado semanalmente. Posteriormente, os animais foram mortos e a gordura mesentérica removida, pesada e utilizada na avaliação inflamatória e estresse oxidativo. **Resultados:** Os animais do grupo obeso atingiram pesos com significância estatística devido a alimentação hiperlipídica. Foi observado um aumento em IL-6 e IL-1 β no grupo não obesos tratados com AuNPs+carnitina. No entanto, não foram observadas diferenças significativas relevantes em IL-6, IL-1 β e IL-10 nos demais grupos. Com relação aos parâmetros oxidativos, os resultados sugerem a produção de dano oxidativo nos animais obesos, com ou em tratamento, sendo que o tratamento com AuNPs+carnitina foi mais expressivo em alguns parâmetros, incluindo no grupo de animais não obesos. **Conclusão:** A associação de AuNPs e carnitina gerou efeitos negativos no grupo sem obesidade e não reverteu as alterações causadas pela obesidade, acredita-se que a associação dessas moléculas em organismo saudável gere estresse e danos.

Palavras chaves: Obesidade. Nanopartícula de ouro. Carnitina. Inflamação. Dano oxidativo.

1. INTRODUÇÃO

A obesidade é uma doença crônica não transmissível que tem crescido de forma alarmante nos últimos anos, sendo considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) uma epidemia¹. Esta doença é multifatorial e está relacionada principalmente ao comportamento alimentar inadequado, estilo de vida, fatores genéticos e ambientais¹.

A obesidade é caracterizada pelo acúmulo anormal de gordura no tecido adiposo de forma que pode comprometer a saúde do indivíduo^{2,3,4}. Deste modo, distúrbios hormonais, como a resistência à leptina, que atua no controle da saciedade, e resistência à insulina, que é responsável pelo metabolismo de glicose, fazem parte da fisiopatologia da obesidade⁵. Nesse sentido, o acúmulo de gordura no tecido adiposo resulta em hiperplasia e hipertrofia de adipócitos e, por consequência, hipóxia tecidual⁶ desencadeando o processo inflamatório⁷. Dessa forma, a obesidade é considerada uma doença inflamatória de baixo grau, pois ao gerar hipóxia no tecido adiposo ocorre o recrutamento de macrófagos iniciando o processo inflamatório, devido a produção excessiva de mediadores pró-inflamatórios⁸. Consoante a isso, a obesidade também é capaz de promover o estresse oxidativo, que pode atuar como causa e consequência do processo inflamatório, comprometendo a função mitocondrial e desencadeando o dano em componentes lipídicos, proteicos e ao material genético, culminando em graves desafios para sobrevivência celular⁹.

Embora a busca pelo entendimento da fisiopatologia e tratamento da obesidade seja grande, ainda assim, são necessários mais estudos sobre abordagens terapêuticas para esta finalidade. O mais recomendado para pacientes com obesidade é aderir a um estilo de vida saudável, baseado em alimentação equilibrada e exercícios físicos¹⁰. Embora existam medicamentos para tratar essa doença, os disponíveis no mercado apresentam efeitos colaterais importantes¹¹. Vale destacar que muitos desses efeitos colaterais ocorrem por não possuírem ação seletiva, com mecanismo de ação sistêmico¹¹. Sendo assim, torna-se interessante a busca científica por novas estratégias farmacológicas para o tratamento da obesidade com foco no processo inflamatório presente nessa doença, visando a qualidade de vida e a

longevidade desses indivíduos¹². Atualmente, a pesquisa de novas terapias já vem sendo estudada, entre as quais se destaca a nanotecnologia como uma área promissora, por ser altamente interdisciplinar e possuir uma ampla gama de aplicações, inclusive, na bioquímica e biotecnologia^{13,14}.

Dentre os nanomateriais disponíveis, existem as nanopartículas de ouro (AuNPs), que tem demonstrado apresentar ação anti-inflamatória e antioxidante^{15,16}. Além disso, as AuNPs representam a principal nanopartícula utilizada no campo biomédico, sendo amplamente utilizadas para diversos objetivos como campo do diagnóstico e no tratamento de doenças com fisiopatologia associada a inflamação, e pela possibilidade de associação a outros materiais em sua superfície^{17,18}. Devido a sua escala nanométrica, a penetração em membranas celulares é facilitada, podendo ser utilizada em uma gama de aplicações biomédicas¹⁹. Outra característica interessante das AuNPs se dá pelo fato de se conjugarem facilmente a outras moléculas, como as que possuem grupamentos tióis e aminas na sua composição química. Dessa forma, existe a possibilidade de funcionalizar e direcionar fármacos para tecidos alvos²⁰, aumentando a efetividade do tratamento, além de exercer suas propriedades intrínsecas, com efeito anti-inflamatório e antioxidante²¹.

Em relação as possíveis associações das AuNPs, a carnitina demonstrou alto potencial de ligação²², sendo encontrada principalmente em alimentos de origem animal, podendo também ser sintetizada de forma endógena²³. Essa molécula atua na translocação de ácidos graxos de cadeia longa do citosol para a mitocôndria para que ocorra a β -oxidação²⁴. Além disso, a carnitina também é essencial no efluxo de grupos acetil e acil para fora da mitocôndria, em situações em que a oxidação ultrapassa a demanda de energia, e, nesse caso, sem a carnitina ocorreria o acúmulo destes grupos na matriz mitocondrial²⁵. Da mesma forma, a carnitina já demonstrou possuir propriedades antioxidantes, agindo na prevenção dos danos oxidativos²⁶. Nesse sentido, torna-se necessária a busca por terapias alternativas que visam melhorar o quadro clínico desses indivíduos.

Dada a vasta utilização de AuNPs para tratamento de doenças de caráter inflamatório e a utilização de carnitina como suplemento que otimiza a viabilidade celular, este estudo é pioneiro em investigar os efeitos de ambas as terapias isoladas e associadas na modulação do processo inflamatório e estresse oxidativo na gordura mesentérica em modelo animal de obesidade.

2. MÉTODOS

2.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO

AuNPs com tamanhos médios de 20 nm foram sintetizadas, a partir de redução química do precursor metálico ácido tetracloroáurico (HAuCl_4) (Sigma-Aldrich, MO, EUA) com o agente redutor e estabilizante citrato de sódio (Nuclear, SP, Brasil). Inicialmente, 100 mL de ácido tetracloroáurico, foi transferido para um balão de fundo redondo, a solução aquecida até 95°C e sob agitação. Solução de citrato de sódio, previamente preparada, é então adicionada, e o sistema mantido à temperatura descrita, agitando durante 20 minutos conforme Turkerich e colaboradores, 1951²⁷. A solução adquiriu a coloração correspondente ao tamanho.

A solução de nanopartículas de ouro foram imediatamente caracterizada empregando-se as técnicas de espectroscopia de ultravioleta-visível (UV-Vis), via monitoramento da banda de superfície de plasmon ressonante, usando um espectrofotômetro modelo UV-1800. Para a espectrometria de UV-visível, a medição da banda de superfície de plasmon ressonante, realizada a temperatura ambiente num espectrofotômetro utilizando uma cubeta de quartzo com 1 cm de caminho ótico. O espectro eletrônico da solução foi no valor de 532 nm para GNPs de 20 nm.

Para a caracterização das nanopartículas foi ainda realizado o potencial zeta que é medido utilizando um equipamento NanoBrook Omni (Brookhaven Instruments Corporation NY, EUA), com controle de temperatura e laser padrão vermelho 640 nm de 40 mW, foram realizadas medições da mobilidade eletroforética (UE) e convertidas em valor em potencial (mV) pelo próprio software do equipamento, as medidas serão em vinte ciclos com intervalo de 1 segundo para cada ciclo. As medidas foram realizadas nas amostras dissolvidas em água deionizada, para as amostras sintetizadas. As amostras terão sua concentração acertada 1,0 mg/mL (solução mãe), e em seguida diluídas na proporção de 1/30 para posterior leitura. As leituras serão realizadas a 25°C.

2.2 CONJUGAÇÃO DE CARNITINA A NANOPARTÍCULA DE OURO

A conjugação das nanopartículas de ouro e carnitina foi realizada adicionando a carnitina na AuNPs, essa mistura ficou em agitação por 1 hora em temperatura ambiente, para que ocorra a reação. A concentração de carnitina foi de 500mg/ml em AuNPs²⁸, a qual foi a concentração mínima testada previamente capaz de ligar a nanopartícula.

2.3 ANIMAIS

Foram utilizados 96 camundongos Swiss machos (*Mus musculus*) com 40 dias de idade, pesando inicialmente entre 30-40g. Os camundongos tinham livre acesso à água e ração e mantidos em ciclos de claro/escuro de 12 horas cada em temperatura de 23±1°C. Foram divididos em grupos com diferentes dietas e tratamento:

- DPS = Dieta padrão + Salina (grupo controle + salina) (n=12);
- DPA = Dieta padrão + AuNPs (grupo controle + AuNPs) (n=12);
- DPC = Dieta padrão + Carnitina (grupo controle + Carnitina) (n=12);
- DPAC = Dieta padrão + AuNPs + Carnitina (grupo controle + AuNPs + Carnitina) (n=12);
- DHS = Dieta hiperlipídica + Salina (grupo obeso + salina) (n=12);
- DHA = Dieta hiperlipídica + AuNPs (grupo obeso + AuNPs) (n=12).
- DHC = Dieta hiperlipídica + Carnitina (grupo obeso + Carnitina) (n=12);
- DHAC = Dieta hiperlipídica + AuNPs + Carnitina (grupo obeso + AuNPs + Carnitina) (n=12);

Foi iniciada a indução de obesidade com alimentação hiperlipídica por 10 semanas, sendo 6 semanas sem tratamento e 4 semanas com tratamento. Ao final das 6 semanas foi iniciado o tratamento com nanopartículas de ouro de 20 nm com concentração de 70ug/kg²⁹ associado ou não a 500mg/kg³⁰ de carnitina, por 4 semanas, 1 vez ao dia. Ao final das 4 semanas foi realizada a eutanásia dos animais para retirada da gordura mesentérica (Figura 2).

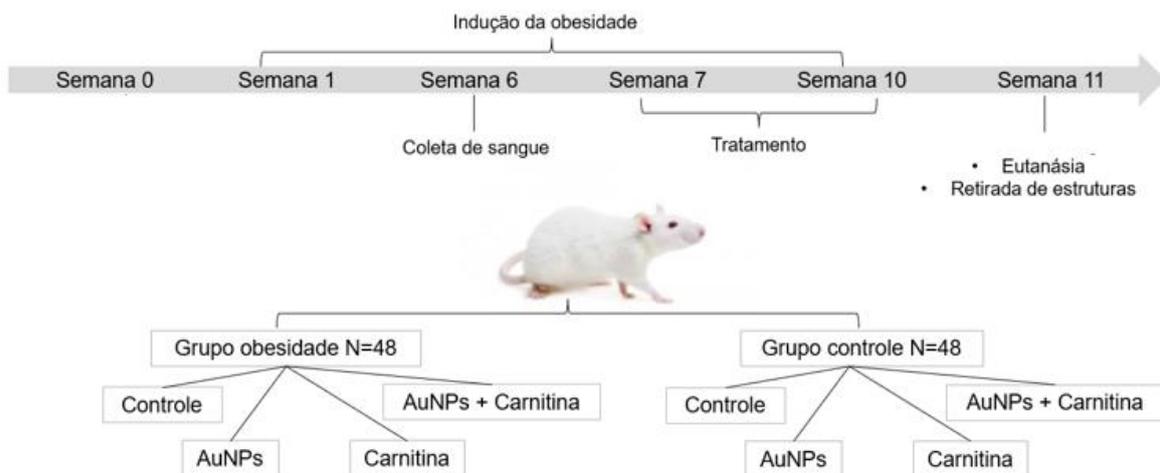


Figura 1 - Desenho experimental: Na semana 1 foi iniciada a indução da obesidade com ração hiperlipídica que continuou até a 10ª semana, sendo que na 7ª, 8ª, 9ª e 10ª semana foram associados os tratamentos. Ao final da 11ª semana, foi realizada a eutanásia e retirada da gordura mesentérica.

2.4 TRATAMENTO DE NANOPARTÍCULA OURO ASSOCIADO A CARNITINA

Os animais dos grupos Carnitina, AuNPS e AuNPs associada a carnitina, receberam o tratamento por 4 semanas após a indução da obesidade, uma vez ao dia, via intraperitoneal. A concentração de AuNPs+Carnitina foi de 500mg/ml, o grupo AuNPs recebeu 70ug/ml de AuNPs, e o grupo carnitina recebeu 500mg/kg de carnitina diluída em salina. Já os grupos controles com ou sem obesidade receberam apenas salina no mesmo tempo que o grupo tratamento.

2.5 REMOÇÃO DOS TECIDOS

Vinte e quatro horas após a última administração, os animais foram eutanasiados a cavidade abdominal aberta, e o tecido adiposo da região mesentérica foi retirado e pesado em balança de alta precisão. Após o tecido removido, parte da amostra foi encaminhada para análise de perfil inflamatório e o restante da estrutura também foi rapidamente isolada para realização das análises parâmetros oxidativos.

2.6 ANÁLISE INFLAMATÓRIA

Os níveis de IL-6, L-1 β e IL-10 foram determinados na gordura mesentérica dos animais pela técnica de *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) em leitor de microplacas com a utilização de kit comercial, seguindo as recomendações do fabricante. Os resultados foram expressos em picogramas por mililitro (pg/ml). Todas as técnicas foram comparadas as proteínas determinadas pelo método de Lowry et al³¹, e a albumina sérica bovina foi utilizada como padrão.

2.7 ANÁLISE DE DANO OXIDATIVO

As concentrações de nitrito/nitrato foram avaliadas espectrofotometricamente na gordura mesentérica usando reagentes griess (1% sulfamilamida em ácido fosfórico de 5% e 0,1% N-1-naftilethylenediamine dihydrochloride em H₂O bi-destilado) e vândio (III). Uma curva padrão foi executada simultaneamente com cada conjunto de amostras, e a densidade óptica a 550 nm (OD550) foi medida usando um leitor de microplaca ELISA³².

O dano oxidativo em lipídios foi avaliado na gordura mesentérica dos animais através da formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme anteriormente descrito por Draper e Hadley³³. A formação de TBARS durante uma reação ácido-aquecimento é amplamente adotada como um método sensível para a medição da peroxidação lipídica. Nesta técnica, as amostras foram misturadas com 1 ml de ácido tricloroacético 10% e 1 ml de ácido tiobarbitúrico 0,67%. Posteriormente, aquecidas em banho de água fervente (100°C) durante 30 min. Os equivalentes de malondialdeído foram determinados pela absorvância em 532 nm.

O dano oxidativo a proteínas foi realizado na gordura mesentérica dos animais, e a avaliação através da determinação de grupamentos carbonilas em proteínas oxidadas, com base na reação com dinitrofenilhidrazina, conforme método descrito por Levine e colaboradores³⁴. Nesta técnica as proteínas são precipitadas por adição de ácido tricloroacético a 20% e dissolvidas em dinitrofenilhidrazina. A absorvância foi avaliada em 370 nm e os resultados expressos em nmol de proteínas carboniladas por mg de proteína (nmol/mg proteína). Todas as técnicas foram comparadas as proteínas determinadas pelo método de Lowry et al³¹, e a albumina sérica bovina utilizada como padrão.

2.8 ANÁLISE DE DEFESA ANTIOXIDANTE

A atividade da enzima antioxidante SOD foi determinada na gordura mesentérica dos animais pela inibição da auto-oxidação da adrenalina medida espectrofotometricamente, conforme descrito por Bannister e Calabrese³⁵. A técnica se baseia na inibição da reação do radical O_2 com adrenalina, composto que se auto-oxida com variação de pH. A oxidação da adrenalina leva à formação de adrenocromo e a atividade da SOD foi determinada medindo-se a velocidade de formação do adrenocromo, determinada espectrofotometricamente a 480 nm, em um meio de reação contendo glicina-NaOH (50 mM em pH 10,2) e adrenalina 60 mM. Os resultados foram expressos em U/mg de proteína.

A atividade da enzima antioxidante CAT foi determinada na gordura mesentérica dos animais através da taxa de decaimento da absorbância do H_2O_2 em 240nm, conforme técnica descrita por Aebi³⁶. Nesta técnica, o tecido foi homogeneizado em tampão fosfato (pH 7,4) e centrifugado durante 10 min. Na sequência, a um meio de reação foi adicionado amostra e 1mL de substrato contendo H_2O_2 e tampão fosfato. As absorbâncias iniciais e finais foram registradas em 1 e 6 min, respectivamente.

Todas as técnicas foram comparadas as proteínas determinadas pelo método de Lowry et al³¹, e a albumina sérica bovina utilizada como padrão.

2.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises foram realizadas utilizando InStat Statistical Software (GraphPad, La Jolla, CA, EUA). As comparações entre os grupos experimentais foram realizadas utilizando o teste t de student e as comparações entre três grupos ou mais foram realizadas utilizando análise de variância (ANOVA) seguido pelo post hoc de Tukey. Os resultados foram apresentados em média \pm desvio padrão e a significância estatística considerada para valores de $p < 0,05$.

3. Resultados

3.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO DE 20NM;

A solução de AuNPs produzida assumiu a coloração roxa, uma característica de AuNPs de 20 nm. O tamanho dos AuNPs foi caracterizado medindo a absorbância com varredura de comprimento de onda (λ) de 400 a 700nm em um espectrofotômetro na faixa UV-vis. As AuNPs de 20 nm atingiram Abs_{max} 440 e λ_{max} de 525,00nm conforme a Figura 2, seguindo em conformidade com outros autores que já relataram esses mesmos achados. Com a associação de carnitina às AuNPs, estas atingiram Abs_{max} 259 e λ_{max} de 527,00nm conforme a Figura 2, comprovando uma mudança na estrutura e sugerindo a ligação das moléculas.

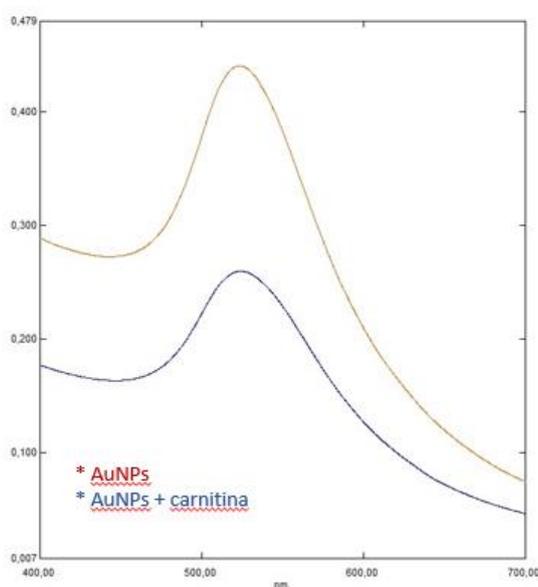


Figura 2 Caracterização de AuNPs e AuNPs associada a carnitina

Associação de AuNPs e carnitina foi determinada pelo diâmetro da molécula e com a metodologia de potencial zeta, a qual faz a medição do potencial elétrico de superfície, importante para prever estabilidade da molécula. Quando o potencial zeta se encontra entre 30mV e -30mV, é sugerida uma maior probabilidade de agregação. A partir dos resultados sugere-se que houve a associação de AuNPs devido as diferenças de potencial zeta e diâmetro.

Grupo	Potencial Zeta (mV)	Diametro (nm)
AuNPs	-16,66	27,08
AuNPs + carnitina	-18,73	59,14

Tabela 1 Potencial zeta demonstra o potencial isoelétrico de superfície que influência na estabilidade da molécula

3.2 Peso corporal

Para o presente estudo foi necessário induzir obesidade em animais, sendo que estes receberam alimentação hiperlipídica por 10 semanas e aumentaram significativamente o peso a partir da 2ª semana (Figura 3). Estudos anteriores²⁹⁻³⁸ demonstram também que a partir da 5ª semana de alimentação hiperlipídica os animais tendem a atingir a obesidade, isso pois, quando comparado com animais que recebem alimentação normolipídica encontra-se uma diferença significativa entre os pesos corporais.

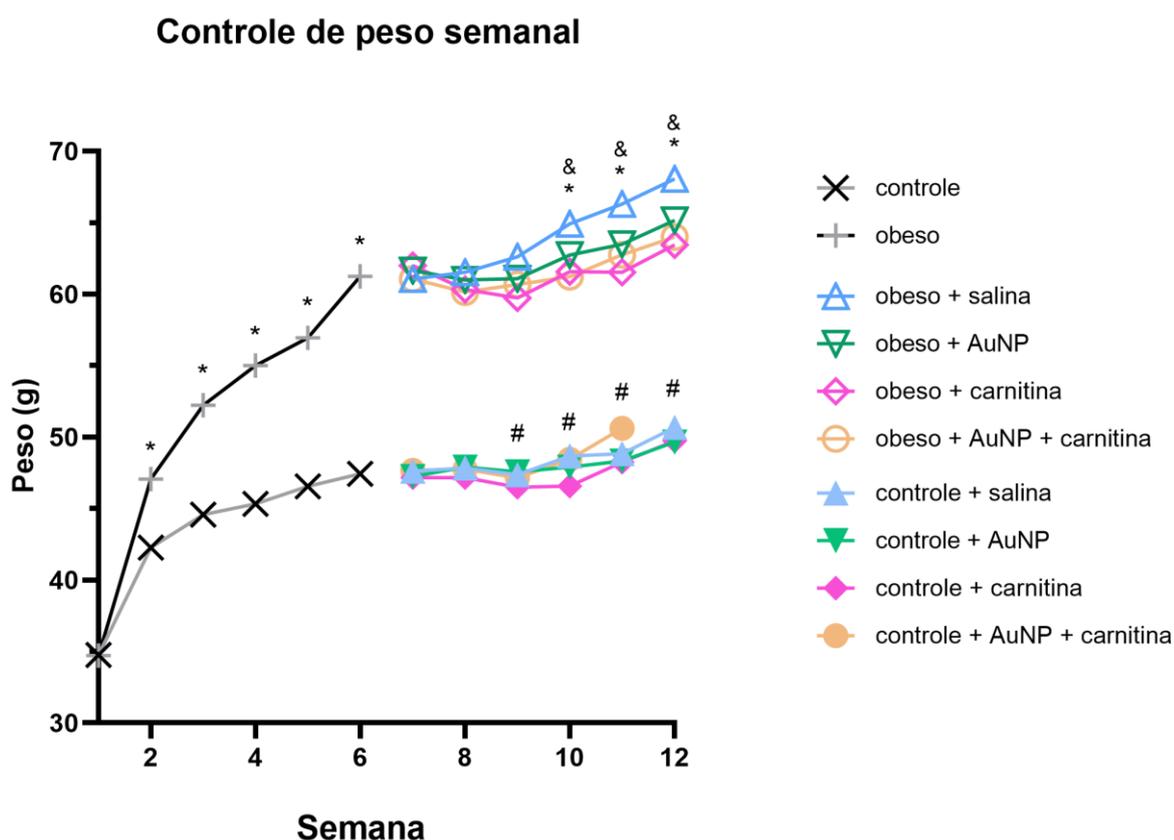


Figura 3. Peso corporal de camundongos submetidos a dieta hiperlipídica e tratados com AuNPs, carnitina ou associação de AuNPs e carnitina. Os dados são expressos pela média ± desvio padrão e analisados por ANOVA com teste post-hoc Tukey. * $p < 0.05$ comparado a semana anterior, # $p < 0.05$ comparado os grupos dieta padrão, & $p < 0.05$ comparados os grupos obesos.

3.3 PESO DA GORDURA MESENTÉRICA

O peso da gordura mesentérica avaliado após 10 semanas de experimento apresentou acúmulo significativo nos grupos com alimentação hiperlipídica quando comparado com os grupos de alimentação normolipídica. Dentre os grupos considerados obesos, ocorreu uma diferença no peso da gordura mesentérica nos grupos com tratamento DHC e DHAC quando comparados com o grupo obeso sem tratamento.

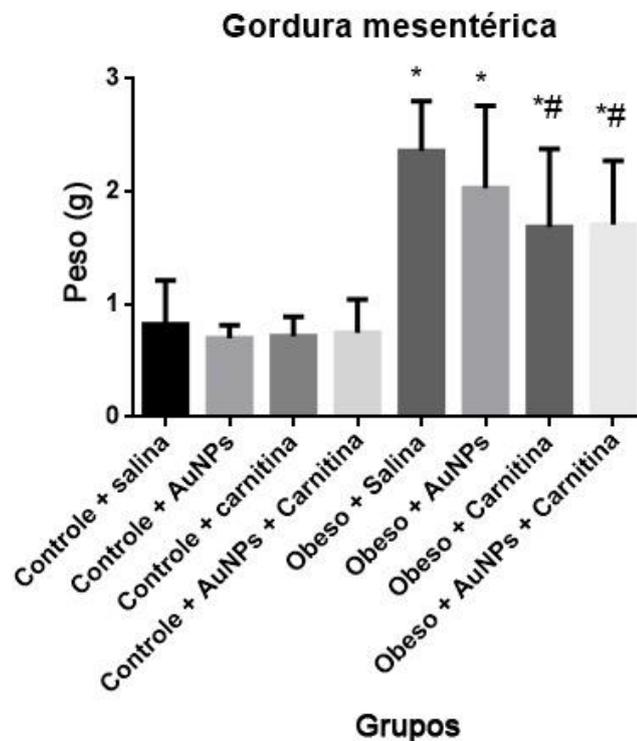


Figura 4. Peso da gordura mesentérica de camundongos submetidos a dieta hiperlipídica e tratados com AuNPs, carnitina ou associação de AuNPs e carnitina. Os dados são expressos pela média \pm desvio padrão e analisados por ANOVA com teste post-hoc Tukey. * $p < 0.05$ comparado ao grupo controle dieta padrão, # $p < 0.05$ comparado ao grupo controle dieta hiperlipídica.

3.4 PERFIL INFLAMATÓRIO NA GORDURA MESENTÉRICA DE CAMUNDONGOS

O parâmetro inflamatório na gordura mesentérica foi obtido através da determinação de interleucinas pro-inflamatórias e anti-inflamatórias. A IL-6, é uma citocina pró-inflamatória, que se apresentou alterada significativamente no grupo DPAC quando comparado com o grupo DPS demonstrando que o tratamento em animais não obesos causou um efeito inflamatório inesperado. No grupo DHAC pode

ser observada uma diminuição significativa quando comparado com o grupo DHS, que de forma geral indica que o tratamento foi eficaz em redução o processo inflamatório causado pela obesidade, além disso quando comparado grupo DPS e DHS não foi identificado diferença significativa e isso indica que a obesidade não promoveu de forma significativa processo inflamatório.

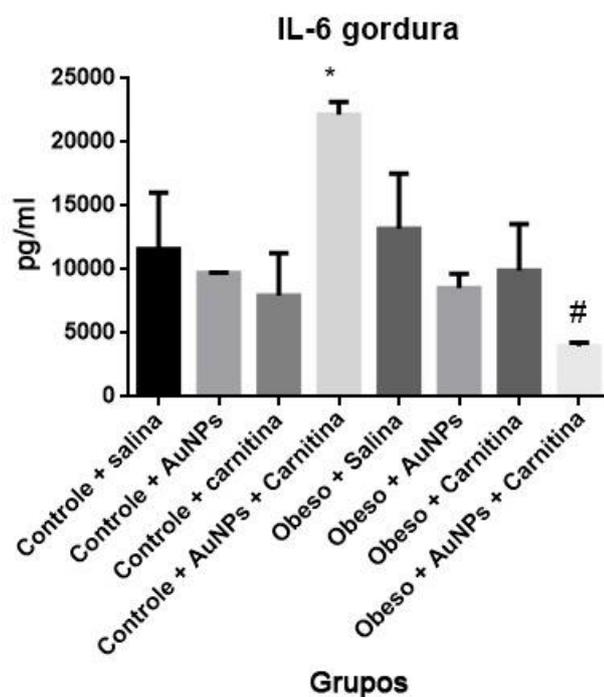


Figura 6. Avaliação de interleucina 6 em gordura mesentérica de camundongos submetidos a dieta hiperlipídica e tratados com AuNPs, cartinitina ou associação de AuNPs e carnitina. Os dados são expressos pela média \pm desvio padrão e analisados por ANOVA com teste post-hoc Tukey. * $p < 0.05$ comparado ao grupo controle dieta padrão, # $p < 0.05$ comparado ao grupo controle dieta hiperlipídica.

A IL-1 β , de ação pró-inflamatória, demonstrou-se alterada significativamente apenas no grupo DPAC quando comparado com o grupo DPS indicando mais uma vez que esse tratamento pode não ser eficaz em condições em que não haja efeito inflamatório instalado. No entanto, no grupo DHAC mesmo que não seja significativa, pode ser observada uma tendência à diminuição quando comparado com o grupo DHS, indicando que quando aplicado em um indivíduo com obesidade, esse tratamento pode evitar a progressão do processo inflamatório.

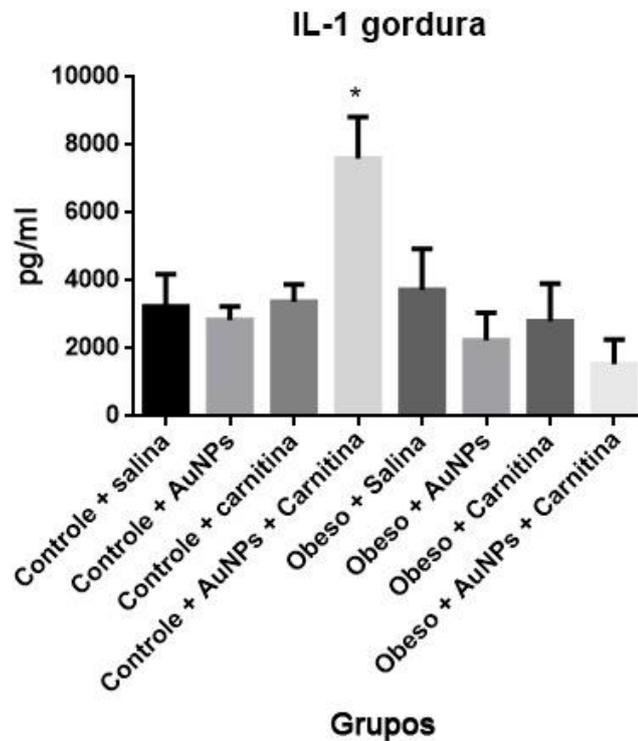


Figura 7. Avaliação de IL-1 β em gordura mesentérica de camundongos submetidos a dieta hiperlipídica e tratados com AuNPs, carnitina ou associação de AuNPs e carnitina. Os dados são expressos pela média \pm desvio padrão e analisados por ANOVA com teste post-hoc Tukey. * $p < 0.05$ comparado ao grupo controle dieta padrão.

Em relação a avaliação da citocina anti-inflamatória IL-10 na gordura mesentérica, não encontramos nenhuma diferença significativa entre os grupos. Contudo observou-se que há uma tendência de aumento no grupo DPAC quando comparado com o grupo DPS e uma tendência a diminuição no grupo DHAC quando comparado com o grupo DHS, seguindo a mesma propensão dos resultados de IL-1 β e IL-6. Dessa forma então ressalta a coerência entre os resultados de parâmetros pró e anti-inflamatórios.

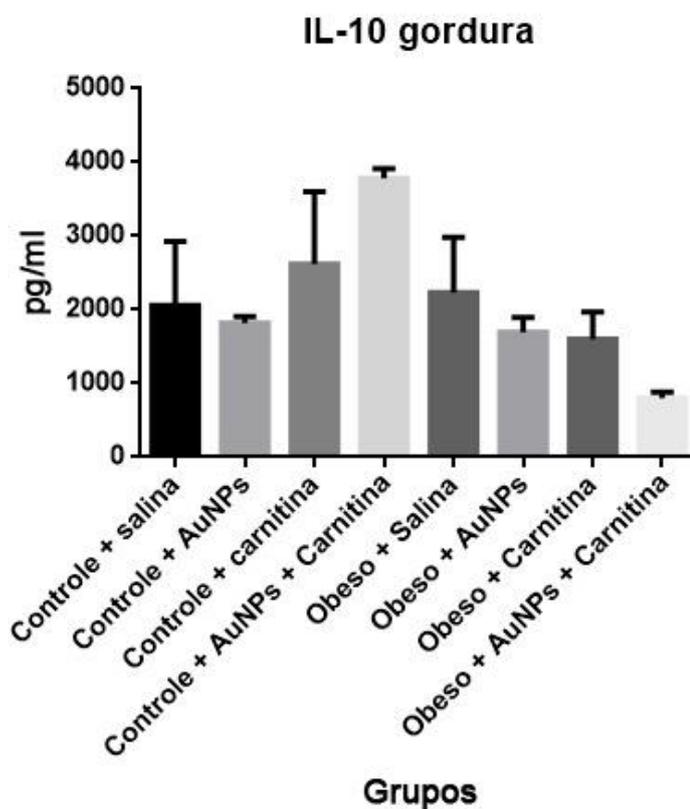


Figura 8. Avaliação de IL- 10 em gordura mesentérica de camundongos submetidos a dieta hiperlipídica e tratados com AuNPs, cartinitina ou associação de AuNPs e carnitina. Os dados são expressos pela média \pm desvio padrão e analisados por ANOVA com teste post-hoc Tukey.

3.4 DANO OXIDATIVO A PROTEÍNAS E LIPÍDEOS NA GORDURA MESENTÉRICA DE CAMUNDONGOS

Para avaliação de dano oxidativo em lipídios foi realizado a técnica TBARS, onde foi identificado o aumento de dano nos grupos obesos quando comparados aos grupos com alimentação padrão, indicando que os tratamentos utilizados nesse estudo não foram eficientes em reduzir a peroxidação lipídica nos animais com obesidade.

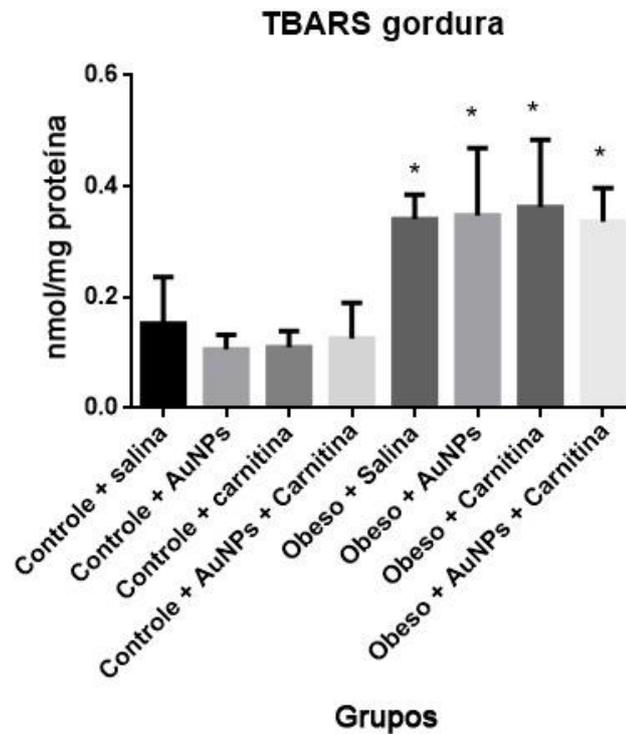


Figura 9. Avaliação de dano em lipídios em gordura mesentérica de camundongos submetidos a dieta hiperlipídica e tratados com AuNPs, cartinitina ou associação de AuNPs e carnitina. Os dados são expressos pela média \pm desvio padrão e analisados por ANOVA com teste post-hoc Tukey. * $p < 0.05$ comparado ao grupo controle dieta padrão, # $p < 0.05$ comparado ao grupo controle ddieta hiperlipidica.

O dano oxidativo em proteínas foi avaliado pela carbonilação proteica, onde observamos redução significativa na formação de grupamentos carbonil nos grupos DHA e DHC. Em contrapartida, a associação de ambos os tratamentos no DHAC não foi capaz de reduzir os níveis de carbonilação proteica, incrementando significativamente um efeito contrário.

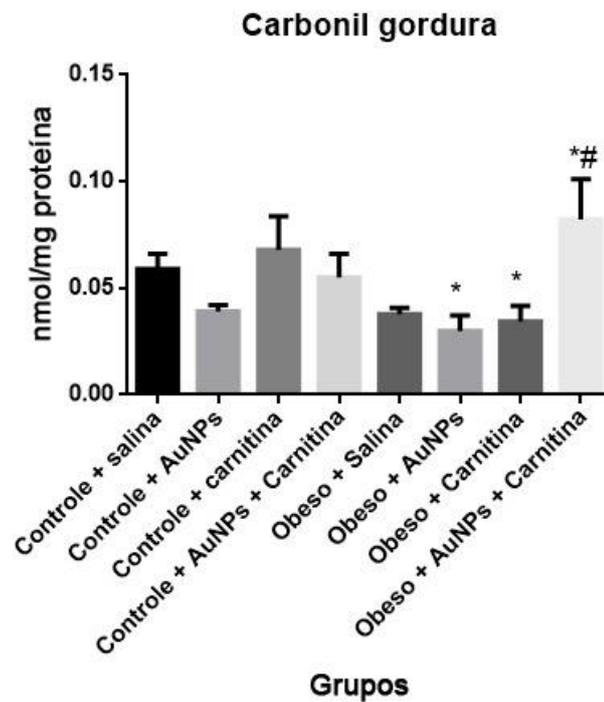


Figura 10. Nível de carbonilação de proteínas em gordura mesentérica de camundongos submetidos a dieta hiperlipídica e tratados com AuNPs, cartinitina ou associação de AuNPs e carnitina. Os dados são expressos pela média \pm desvio padrão e analisados por ANOVA com teste post-hoc Tukey. * $p < 0.05$ quando comparado ao grupo controle dieta padrão, # $p < 0.05$ quando comparado ao grupo controle dieta hiperlipídica.

A avaliação da concentração de nitrito/nitrato (N/N) na gordura mesentérica mostrou-se elevada significativamente nos grupos com obesidade e DPAC, demonstrando que nenhum tratamento conseguiu reverter a produção de espécies reativas de nitrogênio (ERNs) causada pela obesidade. Além disso, o grupo com animais controles e tratados com a associação de AuNPs e carnitina também demonstrou produção ERNs.

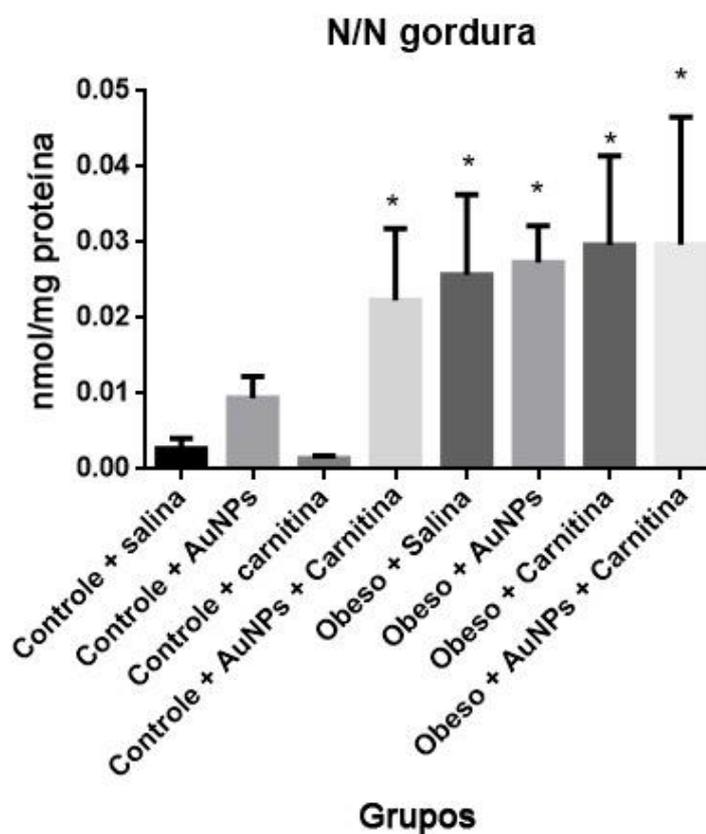


Figura 11. Concentração de N/N em gordura mesentérica de camundongos submetidos a dieta hiperlipídica e tratados com AuNPs, cartinitina ou associação de AuNPs e carnitina. Os dados são expressos pela média \pm desvio padrão e analisados por ANOVA com teste post-hoc Tukey. * $p < 0.05$ comparado ao grupo controle dieta padrão.

Para verificação de defesa antioxidante foi analisada a atividade da enzima SOD, que se mostrou elevada significativamente nos seguintes grupos: DPAC, DHS, DHA e DHC. Diante dos resultados, observa-se que o organismo conseguiu efetivamente detectar o dano causado e promoveu a sinalização para o incremento na produção de defesas antioxidantes. Em contrapartida, no grupo obeso DHAC, não foram observados resultados significativos em relação aos níveis de SOD.

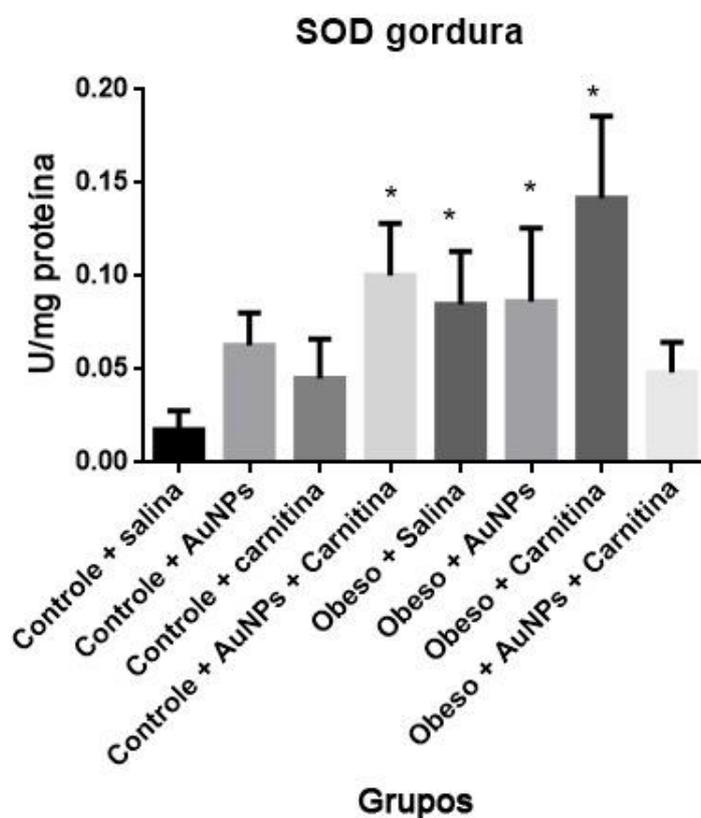


Figura 12. Atividade de SOD em gordura mesentérica de camundongos submetidos a dieta hiperlipídica e tratados com AuNPs, cartinitina ou associação de AuNPs e carnitina. Os dados são expressos pela média \pm desvio padrão e analisados por ANOVA com teste post-hoc Tukey. * $p < 0.05$ comparado ao grupo controle dieta padrão.

Em relação a análise da enzima CAT, foi identificada a redução na sua atividade quando comparados os indivíduos obesos com não obesos. Nesse trabalho, ambos os tratamentos não foram capazes de reverter a situação, o que pode estar relacionada ao esgotamento desse componente enzimático do sistema antioxidante, visto que nesses grupos encontramos a presença de dano oxidativo.

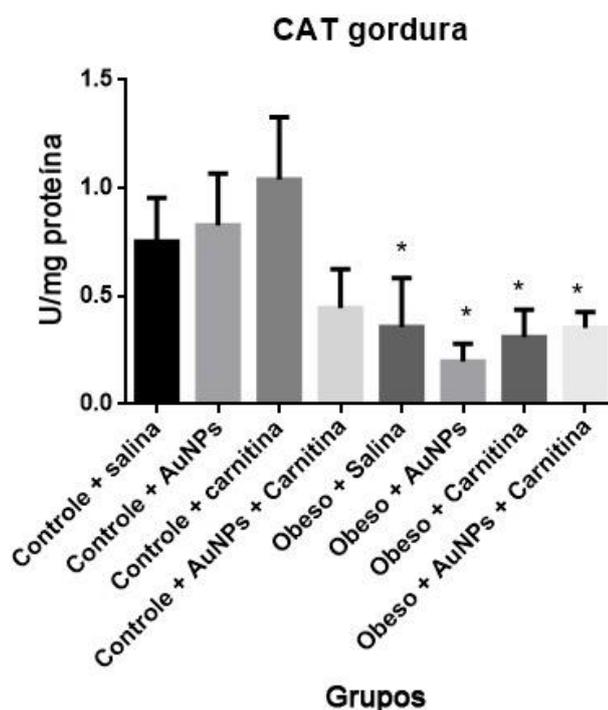


Figura 13. Atividade da enzima CAT em gordura mesentérica de camundongos submetidos a dieta hiperlipídica e tratados com AuNPs, cartinitina ou associação de AuNPs e carnitina. Os dados são expressos pela média \pm desvio padrão e analisados por ANOVA com teste post-hoc Tukey. * $p < 0.05$ comparado ao grupo controle dieta padrão.

4 DISCUSSÃO

Com o objetivo de padronizar o nanomaterial utilizado para o tratamento, neste estudo as AuNPs foram sintetizadas e caracterizadas através de espectroscopia UV-vis. Esta é uma técnica utilizada com frequência para a determinar a conjugação de nanopartículas. Neste caso, a mudança no pico de absorção é detectada quando as nanopartículas são reabsorvidas ou adsorvidas com proteínas ou outras moléculas⁵⁹. Neste estudo, o pico encontrado para as AuNPs foi de 525,00nm, estando de acordo estudo anterior³⁷. Após a associação de carnitina o pico permanece, porém o aumento no comprimento de onda para 527,00nm caracteriza a ligação.

A conjugação provoca uma alteração no padrão de oscilação dos elétrons da banda de condução de maneira semelhante ao aumento do tamanho da nanopartícula. Sendo este aumento após a conjugação das nanopartículas com proteínas, devido à modificação da superfície com a adição da camada de proteína. Esta camada altera o índice de refração da superfície do meio de incorporação. Além disso, durante a ligação covalente com ácido nucleico ou proteína, os grupamentos

tiol ou a ligação tiol-ouro perturbam a nuvem de elétrons de condução na partícula. A eletrodensidade reduzida, por sua vez, culmina no aumento do pico do comprimento de onda^{60,61}.

Como mostrado na Tabela 1, ambos compostos apresentaram tamanho nanométrico e potencial zeta negativo, apresentando força repulsiva suficiente para obter uma boa estabilidade coloidal ao sistema^{62,63}. As AuNPs conjugadas com carnitina apresentaram um potencial zeta menor do que as AuNPs isoladas, sendo que esta diferença provavelmente está relacionada com a maior concentração de substâncias adsorvidas na superfície das AuNPs⁶⁴.

Estudos demonstram que a alta toxicidade de nanopartículas positivamente carregadas é explicada por sua capacidade de entrar facilmente nas células, em contraste com as negativamente carregadas ou neutras. Isto ocorre devido à atração eletrostática entre as glicoproteínas da membrana celular que possuem carga negativa^{65,66}. Uma comparação dos efeitos citotóxicos de nanopartículas com carga positiva x carga negativa, em células HeLa e células NIH/3T3 mostrou que as positivamente carregadas apresentaram maior toxicidade⁶⁷. Isso ocorre não apenas porque nanopartículas positivas penetram mais efetivamente através da membrana, mas também porque elas se ligam mais fortemente ao DNA negativamente carregado, causando danos e, como resultado, prolongamento da fase G0/G1 do ciclo celular. Em contraste, nanopartículas negativamente carregadas não têm efeito sobre o ciclo celular^{65,66}.

A fim de mimetizar mecanismos fisiopatológicos da obesidade, o presente estudo induziu um modelo animal de obesidade através da oferta de dieta rica em gordura, a qual se mostrou eficiente devido ao aumento de peso corporal e diferenças em pesos de gordura mesentérica ao fim de 10 semanas. Esses resultados vão ao encontro a outros estudos²⁹⁻³⁸ que confirmam e padronizam o modelo de obesidade por dieta rica em gordura. Além do peso corporal, o aumento da gordura mesentérica também pode ser utilizado como indicador de obesidade, que aumenta devido ao excesso de nutrientes absorvidos provindos da dieta rica em gordura e armazenados em forma de gordura no tecido adiposo. Nesse estudo, o tratamento com AuNPs isolado não interferiu nesse tecido, porém o tratamento com carnitina e carnitina associado a AuNPs provocou uma redução no peso de gordura em relação ao grupo obeso não tratado, mostrando o efeito principalmente da carnitina, pois aumenta a oxidação por atuar na translocação de ácidos graxos de cadeia longa para dentro da

mitocôndria, dessa forma reduzindo a reserva energética³⁹. Nesse sentido, as AuNPs não demonstraram interferência sobre o peso dos animais, mas sim em parâmetros inflamatórios.

Estudos anteriores^{8,40,41} demonstram que a obesidade provoca aumento em mediadores inflamatórios, como IL-6 no tecido adiposo, por estímulos de leptina. No presente estudo os resultados para níveis de IL-6 foram distintos, pois o grupo DHS não apresentou diferença significativa quando comparado ao grupo DPS, porém um aumento no grupo DPAC em relação ao grupo DPS é observado. Esse resultado sugere que a concentração de leptina secretada pode não ser suficiente para estimulação de citocinas pró-inflamatórias. De forma similar aconteceu com a IL-1 β , onde estudos^{42,43} demonstram que a AuNPs reduz essa citocina, porém neste estudo não foi possível afirmar o mesmo, uma vez que o grupo de animais com obesidade sem tratamento não apresentou diferença significativa, e somente no grupo DPAC observa-se aumento significativo de IL-1 β .

A IL10 é produzida principalmente por células imunes, embora já ter sido demonstrada importante para regulação da homeostase do tecido adiposo e supressão da inflamação⁴⁴. Alguns estudos^{44,45} demonstram que a diminuição de IL-10 secretada por células T reguladoras protegeu contra os efeitos da obesidade induzida por dieta, portanto esses dados sugerem que o bloqueio da sinalização de IL-10 no tecido adiposo pode ter efeitos benéficos no cenário de obesidade e resistência à insulina. Ao contrário do que se espera, a redução de IL-10 nem sempre exacerba a inflamação⁴⁵.

Os efeitos inflamatórios das AuNPs associadas a carnitina observados na gordura de animais não obesos e obesos foram claramente contraditórios. Essa associação causou um efeito inflamatório em animais não obesos, sugerindo que a nova estrutura formada pode ser potencialmente tóxica ao indivíduo saudável, alteração não observada nos animais obesos. Diferente dos tecidos em homeostase, o microambiente do tecido adiposo pode alterar a atividade de nanoterapêuticos⁴⁶, como já demonstrado na literatura quanto as diferenças na farmacocinética de fármacos administrados em indivíduos obesos⁴⁷.

Assim como no perfil inflamatório, observa-se que não houve modulação do quadro de estresse oxidativo. Neste estudo, as AuNPs demonstraram efeitos não esperados, causando modificações oxidativas, representadas pela carbonilação de proteínas e danos a lipídeos. Em estudo anterior⁴⁸, foi realizado uma pesquisa para

verificar a toxicidade e dano causado por AuNPs não revestidas, por administração intraperitoneal. No estudo anterior foi relatada a presença de peroxidação lipídica aumentada e estresse oxidativo, colaborando com os resultados da pesquisa atual.

Para avaliação dos efeitos das AuNPs deve ser considerado o tempo de exposição -se aguda ou crônica-, pois estudos mostram a diferença entre este aspecto. A administração a longo prazo é associada com aumento em níveis de TBARS, carbonilação de proteínas, produção de espécies reativas de oxigênio EROs e aumento na atividade da enzima SOD⁴⁹ semelhante aos resultados encontrados neste estudo.

Uma variedade de nanopartículas, incluindo partículas de metal e de óxido induzem aumento na produção de EROs como um dos principais mecanismos de citotoxicidade⁶⁸. Estudos mostram que as nanopartículas alteram as concentrações intracelulares de cálcio, ativam fatores de transcrição que modulam a produção de citocinas por meio da produção de radicais livres⁶⁹. A presença excessiva de EROs pode causar prejuízo às respostas biológicas, resultando em um quadro de estresse oxidativo. Este fenômeno é o resultado de um desequilíbrio entre a produção de EROs e a capacidade de um sistema biológico de desintoxicar os intermediários reativos ou reparar o dano^{70,71}.

Estudos^{74, 75} mostram a correlação entre a atividade da NADPH oxidase (NOX) e aumento do estresse oxidativo na síndrome metabólica⁷⁴. O aumento na atividade desta enzima leva à produção excessiva de íons superóxidos em animais obesos, que podem reagir com óxido nítrico (NO) e formar ERNs. Estas espécies têm a capacidade de alterar os alvos biomoleculares, como lipídios, proteínas, DNA e antioxidantes de baixo peso molecular. Além disso, o peroxinitrito pode reagir com outras EROs, formando uma variedade de diferentes tipos de ERNs e causam estresse nitrosativo, resultando em danos celulares e de órgãos^{75,76}.

A redução da atividade da CAT quando comparados os grupos obesos com não obesos, somada a produção de N/N na gordura mesentérica nos mesmos grupos, sugere o consumo da enzima antioxidante e a produção de ERNs, sendo que o tratamento não foi capaz de reverter a produção das ERNs causada pela obesidade. Os mesmos parâmetros foram observados no grupo DPAC, sugerindo que o tratamento combinado seja capaz de provocar danos oxidativo em animais não obesos.

Para manter as EROs e ERNs em níveis adequados, os tecidos têm componentes antioxidantes que trabalham sinergicamente para reduzir a citotoxicidade de radicais livres. Algumas enzimas possuem propriedades antioxidantes, incluindo a SOD e CAT. Neste estudo, foi observado um aumento na atividade da SOD para os grupos DPAC, DHS, DHA e DHC. Autores sugeriram que as células aumentam a produção dessa enzima em resposta ao estresse oxidativo, para impedir dano oxidativo mitocondrial^{72,73}. Por outro lado, o grupo DHAC não apresentou diferenças em relação aos níveis de SOD, sugerindo que o tratamento associado possa ter apresentado um efeito protetivo para este parâmetro.

Vale ressaltar que estes resultados estão restritos ao tecido avaliado (gordura mesentérica), podendo as diferenças entre a literatura e os achados deste trabalho estarem relacionadas ao tecido avaliado, bem como ao tempo de exposição. Dados sobre estes parâmetros em outros tecidos seriam relevantes para confirmar e esclarecer estes achados.

A maioria dos estudos atuais com AuNPs^{50,51}, utilizam associações a essas moléculas ou até mesmo utilizam somente como carreadora, a escolha da molécula a ser associada geralmente é algo já bem conhecido na literatura e sabe-se suas ações no organismo, e a grande maioria tem efeito anti-inflamatório e antioxidante, efeitos esses que podem estar contribuindo para que os efeitos de AuNPs isolados não seja visto.

Ao entrar no organismo o material nanoparticulado forma um revestimento de biomoléculas conhecido como bicorona, que podem influenciar nas respostas celulares, esse revestimento tende a variar em cada organismo. Em um estudo⁵² foi demonstrado que AuNPs 20nm em soros de indivíduos com obesidade formou uma bicorona com maior abundância de proteínas e lipídeos (provavelmente impulsionado pela dieta e doença associadas) do que quando comparado com soros de indivíduos saudáveis⁵³. Ainda no estudo anterior⁵², afirma-se que a diferença na bicorona pode alterar a resposta de macrófagos e dessa forma ativar ou não resposta inflamatória. Em AuNPs isoladas a ligação de proteínas dos indivíduos é mais abundante e isso favorece a comunicação com células que geram resposta inflamatória⁵⁴. Com esse mesmo raciocínio sugere-se que a diferença encontrada no perfil inflamatório entre o grupo DHAC e DHA seja também por mudança na formação de bicorona, pois em diferentes nanopartículas a bicorona⁵⁵ é formada com características particulares,

portanto assim que é adicionado a cantina à AuNPs a superfície sofre alterações e, conseqüentemente, forma uma bicorona com particularidades e efeitos diversos.

Neste estudo a escolha da associação de AuNPs à carnitina foi devido aos efeitos benéficos descritos na literatura sobre a carnitina na atuação no metabolismo de lipídeos e a fácil associação com AuNPs⁵⁶. Estudos demonstram os efeitos benéficos de AuNPs em tratamentos de diversas doenças^{57,58} e obesidade⁵⁹, a associação de carnitina e AuNPs para tratamento de obesidade e avaliação de inflamação e dano oxidativo em gordura mesentérica não foi encontrado efeitos benéficos. Além disso, com os resultados aqui apresentados concluiu-se que a associação de AuNPs e carnitina gerou efeitos negativos no grupo sem obesidade, portanto acredita-se que ao entrar na célula normal, sem acúmulo de ácidos graxos, a carnitina suplementada não desempenha a sua função, e por esse motivo poderia ser metabolizada e excretada rapidamente, mas devido a associação com AuNPs essa excreção não acontece rapidamente e assim essas moléculas permanecem por mais tempo dentro da célula gerando o estresse na mesma.

Os resultados aqui encontrados, foram relevantes pois demonstraram divergências em relação a estudos anteriores de investigação dessas moléculas, as quais geralmente demonstram resultados positivos em tratamentos de doenças inflamatórias^{24,65}. Portanto, ressalta-se a importância da investigação dos efeitos dessas moléculas em diferentes organismos, bem como em diferentes tecidos e parâmetros para melhorar o entendimento do seu efeito no tratamento da obesidade.

REFERÊNCIAS

1. OMS. Obesity and overweight. *World Health Organization*
<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
(2020).
2. Linnea R. Freeman¹, Le Zhang¹, Anand Nair², Kalavathi Dasuri¹, Joseph Francis^{1, 2}, S.-O. & Fernandez-Kim¹, Annadora J. Bruce-Keller¹, and J. N. K. Obesity Increases Cerebrocortical Reactive Oxygen Species And Impairs Brain Function. *Bone* **23**, 1–7 (2013).
3. Lasselin, J. & Capuron, L. Chronic low-grade inflammation in metabolic disorders: Relevance for behavioral symptoms. *Neuroimmunomodulation* **21**, 95–101 (2014).
4. Francis, H. & Stevenson, R. The longer-term impacts of Western diet on human cognition and the brain. *Appetite* **63**, 119–128 (2013).
5. Cañete, R., Gil-Campos, M., Aguilera, C. M. & Gil, A. Development of insulin resistance and its relation to diet in the obese child. *Eur. J. Nutr.* **46**, 181–187 (2007).
6. Lindsey A. Muir¹, Christopher K. Neeley², Kevin A. Meyer², Nicki A. Baker², A. M., Brosius^{1, 2}, Alexandra R. Washabaugh², Oliver A. Varban², Jonathan F. Finks², B. F., Zamarron^{1, 3}, Carmen G. Flesher⁴, Joshua S. Chang⁴, Jennifer B. DelProposto¹, L., Geletka¹, Gabriel Martinez-Santibanez^{1, 5}, Niko Kaciroti^{6, 7}, Carey N. Lumeng^{1, 3, 5}, A. & Robert W. O'Rourke^{2, 8}. Adipose tissue fibrosis, hypertrophy, and hyperplasia: correlations with diabetes in human obesity. *Physiol. Behav.* **176**, 139–148 (2016).
7. Ota, T. Obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **5**, 2013–2015 (2014).
8. Catrysse, L. & van Loo, G. Inflammation and the Metabolic Syndrome: The Tissue-Specific Functions of NF-κB. *Trends Cell Biol.* **27**, 417–429 (2017).

9. Siu, P. M., Pistilli, E. E. & Alway, S. E. Apoptotic responses to hindlimb suspension in gastrocnemius muscles from young adult and aged rats. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* **289**, 1015–1027 (2005).
10. Rehm, C. D., Peñalvo, J. L., Afshin, A. & Mozaffarian, D. Dietary intakes among US adults, 1999-2012 HHS Public Access. *Jama* **315**, 2542–2553 (2016).
11. Krentz, A. J., Fujioka, K. & Hompesch, M. Evolution of pharmacological obesity treatments: focus on adverse side-effect profiles. *Diabetes, Obes. Metab.* **18**, 558–570 (2016).
12. de Git, K. C. G. & Adan, R. A. H. Leptin resistance in diet-induced obesity: The role of hypothalamic inflammation. *Obes. Rev.* **16**, 207–224 (2015).
13. Muller, A. P. *et al.* Gold nanoparticles prevent cognitive deficits, oxidative stress and inflammation in a rat model of sporadic dementia of Alzheimer's type. *Mater. Sci. Eng. C* **77**, 476–483 (2017).
14. Nikalje, A. P. Nanotechnology and its Applications in Medicine. *Med. Chem. (Los. Angeles)*. **5**, (2015).
15. da Silva Córneo, E. *et al.* Effects of gold nanoparticles administration through behavioral and oxidative parameters in animal model of Parkinson's disease. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **196**, (2020).
16. Khan, M. A. & Khan, M. j. Nano-gold displayed anti-inflammatory property via NF-KB pathways by suppressing COX-2 activity. (2018).
17. Chiang, M. C. *et al.* Nanogold induces anti-inflammation against oxidative stress induced in human neural stem cells exposed to amyloid-beta peptide. *Neurochem. Int.* **145**, 104992 (2021).
18. M.C. Daniel, D. A. Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward. *Chem. Rev.* **104**, 293– 346 (2004).
19. Peng, J., Liang, X. & Calderon, L. Progress in research on gold nanoparticles

- in cancer management. *Med. (United States)* **98**, (2019).
20. Mukherjee, P. *et al.* Antiangiogenic properties of gold nanoparticles. *Clin. Cancer Res.* **11**, 3530–3534 (2005).
 21. Ojea-Jimenez, I. & Puentes, V. Instability of cationic gold nanoparticle bioconjugates: The role of citrate ions (Journal of the American Chemical Society (2009) 131 (13320-13327)). *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 5322 (2010).
 22. Hu, M. *et al.* Gold nanostructures: Engineering their plasmonic properties for biomedical applications. *Chem. Soc. Rev.* **35**, 1084–1094 (2006).
 23. Ringseis, R., Keller, J. & Eder, K. Role of carnitine in the regulation of glucose homeostasis and insulin sensitivity: Evidence from in vivo and in vitro studies with carnitine supplementation and carnitine deficiency. *Eur. J. Nutr.* **51**, 1–18 (2012).
 24. Pekala, J. *et al.* L-Carnitine - Metabolic Functions and Meaning in Humans Life. *Curr. Drug Metab.* **12**, 667–678 (2011).
 25. Mingorance, C., Rodríguez-Rodríguez, R., Justo, M. L., de Sotomayor, M. Á. & Herrera, M. D. Critical update for the clinical use of L-carnitine analogs in cardiometabolic disorders. *Vasc. Health Risk Manag.* **7**, 169–176 (2011).
 26. Ribas, G. S. *et al.* Oxidative stress parameters in urine from patients with disorders of propionate metabolism: A beneficial effect of L-carnitine supplementation. *Cell. Mol. Neurobiol.* **32**, 77–82 (2012).
 27. Turkevich, J., Stevenson, P. C. & Hillier, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discuss. Faraday Soc.* **11**, 55–75 (1951).
 28. El-Kafoury, B. M. A., Ahmed, M. A., Hammouda, G. A., ElKady, A. H. & Lasheen, N. N. Possible role of l-carnitine in improvement of metabolic and hepatic changes in hyperuricemic and hyperuricemic—Fructose-supplemented rats. *Physiol. Rep.* **7**, 1–14 (2019).
 29. Prá, M. *et al.* Treatment with isolated gold nanoparticles reverses brain

- damage caused by obesity. *Mater. Sci. Eng. C* **120**, 111392 (2021).
30. Cahova, M. *et al.* Carnitine supplementation alleviates lipid metabolism derangements and protects against oxidative stress in non-obese hereditary hypertriglyceridemic rats. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* **40**, 280–291 (2015).
 31. LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. & RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265–275 (1951).
 32. Green, L. C. *et al.* Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* **126**, 131–138 (1982).
 33. Draper, H. H. & Hadley, M. Malondialdehyde determination as index of lipid Peroxidation. *Methods Enzymol.* **186**, 421–431 (1990).
 34. Levine, R. L., Williams, J. A., Stadtman, E. P. & Shacter, E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* **233**, 346–357 (1994).
 35. Bannister, J. V & Calabrese, L. Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem. Anal.* **32**, 279–312 (1987).
 36. Aebi, H. [13] Catalase in Vitro. *Methods Enzymol.* **105**, 121–126 (1984).
 37. Souza, P. S. *et al.* Neuroinflammatory Regulation of Gold Nanoparticles Conjugated to Ethylene Dicycysteine Diethyl Ester in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **7**, 1242–1251 (2021).
 38. Noeman, S. A., Hamooda, H. E. & Baalash, A. A. Biochemical study of oxidative stress markers in the liver, kidney and heart of high fat diet induced obesity in rats. *Diabetol. Metab. Syndr.* **3**, 1–8 (2011).
 39. Console, L. *et al.* Carnitine Traffic in Cells. Link With Cancer. *Front. Cell Dev. Biol.* **8**, 1–16 (2020).
 40. Baltieri, L. *et al.* Correlation between levels of adipokines and inflammatory mediators with spirometric parameters in individuals with obesity and

- symptoms of asthma: Cross-sectional study. *Pulmonology* **28**, 105–112 (2022).
41. Schwarzenberg, S. J. & Sinaiko, A. R. Obesity and inflammation in children. *Paediatr. Respir. Rev.* **7**, 239–246 (2006).
 42. Sumbayev, V. V. *et al.* Gold nanoparticles downregulate interleukin-1 β -induced pro-inflammatory responses. *Small* **9**, 472–477 (2013).
 43. Khan, M. A. & Khan, M. J. Nano-gold displayed anti-inflammatory property via NF-kB pathways by suppressing COX-2 activity. *Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol.* **46**, 1149–1158 (2018).
 44. Lakhani, C. M., Tierney, B. T., Jian, A. K., Pate, M. & J, Y. P. M. V. and C. IL-10 Signaling Remodels Adipose Chromatin Architecture to Limit Thermogenesis and Energy Expenditure Prashant. *Physiol. Behav.* **176**, 139–148 (2019).
 45. Jessica L Faulkner, Jessica R Gomolak & Sean P Didion. INTERLEUKIN-10 DEFICIENCY LIMITS THE DEVELOPMENT OF OBESITY AND INSULIN RESISTANCE PRODUCED BY A HIGH FAT DIET. *faseb J.* **27**, 1183.6 (2013).
 46. Essa, N., O'Connell, F., Prina-Mello, A., O'Sullivan, J. & Marcone, S. Gold nanoparticles and obese adipose tissue microenvironment in cancer treatment. *Cancer Lett.* **525**, 1–8 (2022).
 47. Asempa, T. E., Izmailyan, S., Lawrence, K. & Nicolau, D. P. Efficacy and Safety of Eravacycline in Obese Patients: A Post Hoc Analysis of Pooled Data from the IGNITE1 and IGNITE4 Clinical Trials. *Open Forum Infect. Dis.* **7**, 1–7 (2020).
 48. Abdelhalim, M. A. K., Moussa, S. A. A., Qaid, H. A. Y. & Al-Ayed, M. S. Potential effects of different natural antioxidants on inflammatory damage and oxidative-mediated hepatotoxicity induced by gold nanoparticles. *Int. J. Nanomedicine* **13**, 7931–7938 (2018).
 49. Ferreira, G. K. *et al.* Gold nanoparticles alter parameters of oxidative stress and energy metabolism in organs of adult rats. *Biochem. Cell Biol.* **93**, 548–557

(2015).

50. Paciotti, G. F. *et al.* Synthesis and Evaluation of Paclitaxel-Loaded Gold Nanoparticles for Tumor-Targeted Drug Delivery. *Bioconjug. Chem.* **27**, 2646–2657 (2016).
51. Thovhogi, N., Sibuyi, N., Meyer, M., Onani, M. & Madiehe, A. Targeted delivery using peptide-functionalised gold nanoparticles to white adipose tissues of obese rats. *J. Nanoparticle Res.* **17**, (2015).
52. Kobos, L. M. *et al.* An integrative proteomic/lipidomic analysis of the gold nanoparticle biocorona in healthy and obese conditions. *Appl. Vitro. Toxicol.* **5**, 150–166 (2019).
53. Eisinger, K. *et al.* Lipidomic analysis of serum from high fat diet induced obese mice. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 2991–3002 (2014).
54. Mitri, N., Rahme, K., Fracasso, G. & Ghanem, E. Human blood biocompatibility and immunogenicity of scFvD2B PEGylated gold nanoparticles. *Nanotechnology* **33**, (2022).
55. Vogt, N. M. *et al.* Gut microbiome alterations in Alzheimer's disease. *Sci. Rep.* **7**, 1–11 (2017).
56. Xu, Y. *et al.* L-carnitine treatment of insulin resistance: A systematic review and meta-analysis. *Adv. Clin. Exp. Med.* **26**, 333–338 (2017).
57. dos Santos Haupenthal, D. P. *et al.* Effects of treatment with gold nanoparticles in a model of acute pulmonary inflammation induced by lipopolysaccharide. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **108**, 103–115 (2020).
58. Gao, L. *et al.* Anti-obesity activity of gold nanoparticles synthesized from *Salacia chinensis* modulates the biochemical alterations in high-fat diet-induced obese rat model via AMPK signaling pathway. *Arab. J. Chem.* **13**, 6589–6597 (2020).
59. Chen, H., Ng, J. P. M., Bishop, D. P., Milthorpe, B. K. & Valenzuela, S. M. Gold nanoparticles as cell regulators: Beneficial effects of gold nanoparticles on the

metabolic profile of mice with pre-existing obesity 11 Medical and Health Sciences 1103 Clinical Sciences. *J. Nanobiotechnology* **16**, 1–13 (2018).

59. Rayavarapu, R. G., Petersen, W., Ungureanu, C., Post, J. N., van Leeuwen, T. G., & Manohar, S. (2007). Synthesis and bioconjugation of gold nanoparticles as potential molecular probes for light-based imaging techniques. *International journal of biomedical imaging*, 29817 (2007).
60. Zijlstra, P., Paulo, P. M., Yu, K., Xu, Q. H., & Orrit, M. Chemical interface damping in single gold nanorods and its near elimination by tip-specific functionalization. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 51(33), 8352–8355 (2012).
61. Maraming, P., & Kah, J. (2021). Conjugation of Peptides to Gold Nanoparticles. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 2355, 9–16 (2021).
62. He C, Hu Y, Yin L, Tang C, Yin C. Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Biomaterials*, v. 31, n. 13, p. 3657–3666 (2010).
63. Joseph E, Singhvi G. Multifunctional nanocrystals for cancer therapy: A potential nanocarrier. *Nanomaterials for Drug Delivery and Therapy*. p. 91–116 (2020).
64. Feuser PE, Bubniak LS, Bubniak LS, Valério A, Santos-Silva MC, Ricci-Junior E, Sayer C, Araújo PHH. In Vitro Cytotoxicity of Poly(Methyl Methacrylate) Nanoparticles and Nanocapsules Obtained by Miniemulsion Polymerization for Drug Delivery Application. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 16, n. 7, p. 7669–7676, (2016).
65. Fornaguera C, Calderó G, Mitjans M, Vinardell MP, Solans C, Vauthier C. Interactions of PLGA nanoparticles with blood components: Protein adsorption, coagulation, activation of the complement system and hemolysis studies. *Nanoscale*. v. 7, n. 14, p. 6045–6058 (2015).

66. Sukhanova A, Bozrova S, Sokolov P, Berestovoy M, Karaulov A, Nabiev I. Dependence of Nanoparticle Toxicity on Their Physical and Chemical Properties. *Nanoscale Research Letters*. v. 13, 2018.
67. Liu Y, Li W, Lao F, Liu Y, Wang L, Bai Ru, Zhao Y, Chen C. Intracellular dynamics of cationic and anionic polystyrene nanoparticles without direct interaction with mitotic spindle and chromosomes. *Biomaterials*, v. 32, n. 32, p. 8291–8303, 1 nov (2011).
68. Risom L, Møller P, Loft S. Oxidative stress-induced DNA damage by particulate air pollution. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis.*, 2005.
69. Li, J. J., Muralikrishnan, S., Ng, C. T., Yung, L. Y., & Bay, B. H. Nanoparticle-induced pulmonary toxicity. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)*, 235(9), 1025–1033(2010).
70. Huang CC, Aronstam RS, Chen D-R, Huang YW. Oxidative stress, calcium homeostasis, and altered gene expression in human lung epithelial cells exposed to ZnO nanoparticles. *Toxicology in Vitro*, v. 24, n. 1, p. 45–55, 1 fev (2010).
71. Thakor AS, Paulmurugan R, Kempen P, Zavaleta C, Sinclair R, Massoud TF, Gambhir SS. Oxidative stress mediates the effects of Raman-active gold nanoparticles in human cells. *Small*, v. 7, n. 1, p. 126–136 (2011).
72. Baynes J. W. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes*. ;40(4):405–412(1991).
73. Baynes J. W., Thorpe S. R. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes*.48(1):1–9 (1999).
74. P. Holvoet, S.B. Kritchevsky, R.P. Tracy, A. Mertens, S.M. Rubin, J. Butler, B. Goodpaster, T.B. Harris, The metabolic syndrome, circulating oxidized LDL, and risk of myocardial infarction in well-functioning elderly people in the health, aging, and body composition cohort, *Diabetes*. 53 1068-1073(2004).

75. F. Jiang, H.K. Lim, M.J. Morris, L. Prior, E. Velkoska, X. Wu, G.J. Dusting. Systemic upregulation of NADPH oxidase in diet-induced obesity in rats. *Redox Rep.* 16 223- 229. 26(2011).
76. J.S. Beckman, W.H. Koppenol, Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: The good, the bad, and ugly, *Am. J. Physiol.* 271 C1424-C1437(1996).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados encontrados aqui, foram relevantes pois demonstrou divergências em relação a estudos anteriores de investigação dessas moléculas, as quais geralmente demonstram resultados positivos em tratamentos de doenças inflamatórias. Para futuros trabalhos pode-se considerar alterar o tempo de indução da obesidade, iniciando o tratamento após a 10^a semana talvez dessa forma as alterações em perfil inflamatório e oxidativo mais expressivas devido ao tempo do animal submetido ao modelo de obesidade a qual é considerada uma inflamação de baixo grau. Outra investigação importante seria, avaliação semanal do perfil inflamatório e oxidativo, para assim dessa forma ter a certeza de qual momento inicia a inflamação e com isso iniciar o tratamento..

6. REFERÊNCIAS

1. OMS. Obesity and overweight. *World Health Organization* <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> (2020).
2. Linnea R. Freeman¹, Le Zhang¹, Anand Nair², Kalavathi Dasuri¹, Joseph Francis^{1, 2}, S.-O. & Fernandez-Kim¹, Annadora J. Bruce-Keller¹, and J. N. K. Obesity Increases Cerebrocortical Reactive Oxygen Species And Impairs Brain Function. *Bone* **23**, 1–7 (2013).
3. Lasselin, J. & Capuron, L. Chronic low-grade inflammation in metabolic disorders: Relevance for behavioral symptoms. *Neuroimmunomodulation* **21**, 95–101 (2014).
4. Francis, H. & Stevenson, R. The longer-term impacts of Western diet on human cognition and the brain. *Appetite* **63**, 119–128 (2013).
5. Cañete, R., Gil-Campos, M., Aguilera, C. M. & Gil, A. Development of insulin resistance and its relation to diet in the obese child. *Eur. J. Nutr.* **46**, 181–187 (2007).
6. Lindsey A. Muir¹, Christopher K. Neeley², Kevin A. Meyer², Nicki A. Baker², A. M., Brosius^{1, 2}, Alexandra R. Washabaugh², Oliver A. Varban², Jonathan F. Finks², B. F., Zamarron^{1, 3}, Carmen G. Flesher⁴, Joshua S. Chang⁴, Jennifer B. DelProposto¹, L., Geletka¹, Gabriel Martinez-Santibanez^{1, 5}, Niko Kaciroti⁶, 7, Carey N. Lumeng^{1, 3, 5}, A. & Robert W. O'Rourke^{2, 8}. Adipose tissue fibrosis, hypertrophy, and hyperplasia: correlations with diabetes in human obesity. *Physiol. Behav.* **176**, 139–148 (2016).
7. Tartuce, L. P. *et al.* 2-Methoxy-Isobutyl-Isonitrile-Conjugated Gold Nanoparticles Improves Redox and Inflammatory Profile in Infarcted Rats. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **192**, 111012 (2020).
8. Siu, P. M., Pistilli, E. E. & Alway, S. E. Apoptotic responses to hindlimb suspension in gastrocnemius muscles from young adult and aged rats. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* **289**, 1015–1027 (2005).
9. Rehm, C. D., Peñalvo, J. L., Afshin, A. & Mozaffarian, D. Dietary intakes among US adults, 1999-2012 HHS Public Access. *Jama* **315**, 2542–2553 (2016).

10. Krentz, A. J., Fujioka, K. & Hompesch, M. Evolution of pharmacological obesity treatments: focus on adverse side-effect profiles. *Diabetes, Obes. Metab.* **18**, 558–570 (2016).
11. de Git, K. C. G. & Adan, R. A. H. Leptin resistance in diet-induced obesity: The role of hypothalamic inflammation. *Obes. Rev.* **16**, 207–224 (2015).
12. Muller, A. P. *et al.* Gold nanoparticles prevent cognitive deficits, oxidative stress and inflammation in a rat model of sporadic dementia of Alzheimer's type. *Mater. Sci. Eng. C* **77**, 476–483 (2017).
13. Nikalje, A. P. Nanotechnology and its Applications in Medicine. *Med. Chem. (Los Angeles)*. **5**, (2015).
14. Kesavan, A. & Venkatraman, G. Nanotechnology and its applications in surgery. *Br. J. Surg.* **97**, 463–465 (2014).
15. Morose, G. The 5 principles of 'Design for Safer Nanotechnology'. *J. Clean. Prod.* **18**, 285–289 (2010).
16. da Silva Córneo, E. *et al.* Effects of gold nanoparticles administration through behavioral and oxidative parameters in animal model of Parkinson's disease. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **196**, (2020).
17. Khan, M. A. & Khan, M. j. Nano-gold displayed anti-inflammatory property via NF-KB pathways by suppressing COX-2 activity. (2018).
18. Chiang, M. C. *et al.* Nanogold induces anti-inflammation against oxidative stress induced in human neural stem cells exposed to amyloid-beta peptide. *Neurochem. Int.* **145**, 104992 (2021).
19. Hu, M. *et al.* Gold nanostructures: Engineering their plasmonic properties for biomedical applications. *Chem. Soc. Rev.* **35**, 1084–1094 (2006).
20. Pekala, J. *et al.* L-Carnitine - Metabolic Functions and Meaning in Humans Life. *Curr. Drug Metab.* **12**, 667–678 (2011).
21. Ribas, G. S. *et al.* Oxidative stress parameters in urine from patients with disorders of propionate metabolism: A beneficial effect of L-carnitine supplementation. *Cell. Mol. Neurobiol.* **32**, 77–82 (2012).
22. Rosini, T. C., da Silva, A. S. R. & Moraes, C. de. Obesidade induzida por consumo de dieta: modelo em roedores para o estudo dos distúrbios relacionados com a obesidade. *Rev. Assoc. Med. Bras.* **58**, 383–387 (2012).
23. VIGILÂNCIA DE FATORES DE RISCO E PROTEÇÃO PARA DOENÇAS CRÔNICAS POR INQUÉRITO TELEFÔNICO. *Ministerio da Saúde* (2019).

24. IBGE. No Title.
[https://www.ibge.gov.br/busca.html?searchword=obesidade#:~:text=Busca %7C IBGE&text=61%2C7%25 dos brasileiros estavam,%2C8%25%2C em 2019.](https://www.ibge.gov.br/busca.html?searchword=obesidade#:~:text=Busca%7C%20IBGE&text=61%2C7%25%20dos%20brasileiros%20estavam,%2C8%25%2C%20em%202019.)
25. Salazar-Sepúlveda, L. L. & Villarreal-Pérez, J. Z. Impact of diagnosis of overweight and obesity on weight management among hospitalized patients. *Obes. Res. Clin. Pract.* **13**, 164–167 (2019).
26. AC, F. Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica. <https://abeso.org.br/conceitos/obesidade-e-sindrome-metabolica/>.
27. Mazon, J. N., de Mello, A. H., Ferreira, G. K. & Rezin, G. T. The impact of obesity on neurodegenerative diseases. *Life Sci.* **182**, 22–28 (2017).
28. Prá, M. *et al.* Treatment with isolated gold nanoparticles reverses brain damage caused by obesity. *Mater. Sci. Eng. C* **120**, 111392 (2021).
29. Costa, J. V. & Duarte, J. S. Tecido adiposo e adipocinas. *Acta Med. Port.* **19**, 251–256 (2006).
30. Aparecida, P., Freitas, C., Colato, A. S., Peres, A. & Camargo, J. L. Relação entre leptina, obesidade e exercício físico. *Clin. Biomed. Res.* **33**, 238–247 (2013).
31. Youssef, D. M., Elbehidy, R. M., Shokry, D. M. & Elbehidy, E. M. The influence of leptin on Th1/Th2 balance in obese children with asthma. *J. Bras. Pneumol.* **39**, 562–568 (2013).
32. Friedman, J. M. Leptin at 14 y of age: An ongoing story. *Am. J. Clin. Nutr.* **89**, 973–979 (2009).
33. Coppari, R. & Bjørnbæk, C. Leptin revisited: Its mechanism of action and potential for treating diabetes. *Nat. Rev. Drug Discov.* **11**, 692–708 (2012).
34. Münzberg, H. & Myers, M. G. Molecular and anatomical determinants of central leptin resistance. *Nat. Neurosci.* **8**, 566–570 (2005).
35. Jung, C. H. & Kim, M. S. Molecular mechanisms of central leptin resistance in obesity. *Arch. Pharm. Res.* **36**, 201–207 (2013).
36. Janssen, I., Katzmarzyk, P. T. & Ross, R. Waist circumference and not body mass index explains obesity- related health risk 1 – 3. 5–7 (2004).
37. Singla, P. Metabolic effects of obesity: A review. *World J. Diabetes* **1**, 76 (2010).
38. Johnson, A. R., Justin Milner, J. & Makowski, L. The inflammation highway:

- Metabolism accelerates inflammatory traffic in obesity. *Immunol. Rev.* **249**, 218–238 (2012).
39. Schwarzenberg, S. J. & Sinaiko, A. R. Obesity and inflammation in children. *Paediatr. Respir. Rev.* **7**, 239–246 (2006).
 40. Higgins, S. C., Gueorguiev, M. & Korbonits, M. Ghrelin, the peripheral hunger hormone. *Ann. Med.* **39**, 116–136 (2007).
 41. Beutler, L. R. *et al.* Obesity causes selective and long-lasting desensitization of agrp neurons to dietary fat. *Elife* **9**, 1–21 (2020).
 42. Pradhan, G., Samson, S. L. & Sun, Y. Ghrelin: Much more than a hunger hormone. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **16**, 619–624 (2013).
 43. Tucsek, Z. *et al.* Obesity in aging exacerbates blood-brain barrier disruption, neuroinflammation, and oxidative stress in the mouse hippocampus: Effects on expression of genes involved in beta-amyloid generation and Alzheimer's disease. *Journals Gerontol. - Ser. A Biol. Sci. Med. Sci.* **69**, 1212–1226 (2014).
 44. Yu, C. *et al.* Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. *J. Biol. Chem.* **277**, 50230–50236 (2002).
 45. Samuel, V. T. & Shulman, G. I. The pathogenesis of insulin resistance: Integrating signaling pathways and substrate flux. *J. Clin. Invest.* **126**, 12–22 (2016).
 46. Kelsey C. Martin Mhatre V. Ho, J.-A. L. Obesity induced by a high-fat diet is associated with increased immune cell entry into the central nervous system. *Bone* **23**, 1–7 (2012).
 47. Leite, L. D., Rocha, E. D. D. M. & Brandão-Neto, J. Obesity: an inflammatory disease. *Journ. Annu. Diabetol. Hotel. Dieu.* 115–128 (2009).
 48. Catrysse, L. & van Loo, G. Inflammation and the Metabolic Syndrome: The Tissue-Specific Functions of NF- κ B. *Trends Cell Biol.* **27**, 417–429 (2017).
 49. Könner, A. C. & Brüning, J. C. Selective insulin and leptin resistance in metabolic disorders. *Cell Metab.* **16**, 144–152 (2012).
 50. Donath, M. Y. & Shoelson, S. E. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 98–107 (2011).
 51. Moore, K. J. & Tabas, I. The Cellular Biology of Macrophages in Atherosclerosis. *Cell* **145**, 341–355 (2011).
 52. Noeman, S. A., Hamooda, H. E. & Baalash, A. A. Biochemical study of

- oxidative stress markers in the liver, kidney and heart of high fat diet induced obesity in rats. *Diabetol. Metab. Syndr.* **3**, 1–8 (2011).
53. Furukawa, S. *et al.* Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J. Clin. Invest.* **114**, 1752–1761 (2004).
 54. Angelopoulou, R., Lavranos, G. & Manolakou, P. ROS in the aging male: Model diseases with ROS-related pathophysiology. *Reprod. Toxicol.* **28**, 167–171 (2009).
 55. Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S. & Kalayci, O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ. J.* **5**, 9–19 (2012).
 56. Avelar, T. M. T. *et al.* Oxidative stress in the pathophysiology of metabolic syndrome: Which mechanisms are involved? *J. Bras. Patol. e Med. Lab.* **51**, 231–239 (2015).
 57. Bournat, J. C. & Brown, C. W. Mitochondrial dysfunction in obesity. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* **17**, 446–452 (2010).
 58. Heo, J. *et al.* Effects of exercise on obesity-induced mitochondrial dysfunction in skeletal muscle. **21**, 567–577 (2017).
 59. Kelek, S. E., Afşar, E., Akçay, G., Danişman, B. & Aslan, M. Effect of chronic L-carnitine supplementation on carnitine levels, oxidative stress and apoptotic markers in peripheral organs of adult Wistar rats. *Food Chem. Toxicol.* **134**, (2019).
 60. Boekema, E. J. & Braun, H. P. Supramolecular structure of the mitochondrial oxidative phosphorylation system. *J. Biol. Chem.* **282**, 1–4 (2007).
 61. Rogge, M. M. The role of impaired mitochondrial lipid oxidation in obesity. *Biol. Res. Nurs.* **10**, 356–373 (2009).
 62. Elmore, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol. Pathol.* **35**, 495–516 (2007).
 63. Sandri, M. *et al.* Caspase 3 expression correlates with skeletal muscle apoptosis in Duchenne and facioscapulo human muscular dystrophy. A potential target for pharmacological treatment? *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **60**, 302–312 (2001).
 64. Alway, S. E. & Siu, P. M. Nuclear apoptosis contributes to sarcopenia. *Exerc. Sport Sci. Rev.* **36**, 51–57 (2008).
 65. Castro, A. I. *et al.* Effect of a very low-calorie ketogenic diet on food and alcohol cravings, physical and sexual activity, sleep disturbances, and quality

- of life in obese patients. *Nutrients* **10**, (2018).
66. Moreno, B., Crujeiras, A. B., Bellido, D., Sajoux, I. & Casanueva, F. F. Obesity treatment by very low-calorie-ketogenic diet at two years: reduction in visceral fat and on the burden of disease. *Endocrine* **54**, 681–690 (2016).
 67. Mancini, M. C. & Halpern, A. Tratamento Farmacológico da Obesidade. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.* **46**, 497–512 (2002).
 68. Nikalje, A. P. Nanotechnology and its Applications in Medicine. *Med. Chem. (Los Angeles)*. **5**, 81–89 (2015).
 69. Zhang, Y., Yu, J., Qiang, L. & Gu, Z. Nanomedicine for obesity treatment. *Sci. China Life Sci.* **61**, 373–379 (2018).
 70. Bhattacharya, R. & Mukherjee, P. Biological properties of ‘naked’ metal nanoparticles. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **60**, 1289–1306 (2008).
 71. Vieira, D. B. & Gamarra, L. F. Advances in the use of nanocarriers for cancer diagnosis and treatment. *Einstein (Sao Paulo)*. **14**, 99–103 (2016).
 72. Thovhogi, N., Sibuyi, N., Meyer, M., Onani, M. & Madiehe, A. Targeted delivery using peptide-functionalised gold nanoparticles to white adipose tissues of obese rats. *J. Nanoparticle Res.* **17**, (2015).
 73. Kesharwani, P. *et al.* Nanotechnology based approaches for anti-diabetic drugs delivery. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **136**, 52–77 (2018).
 74. M.C. Daniel, D. A. Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward. *Chem. Rev.* **104**, 293–346 (2004).
 75. Peng, J., Liang, X. & Calderon, L. Progress in research on gold nanoparticles in cancer management. *Med. (United States)* **98**, (2019).
 76. Sela, H. *et al.* Spontaneous penetration of gold nanoparticles through the blood brain barrier (BBB). *J. Nanobiotechnology* **13**, 1–9 (2015).
 77. Mukherjee, P. *et al.* Antiangiogenic properties of gold nanoparticles. *Clin. Cancer Res.* **11**, 3530–3534 (2005).
 78. Ojea-Jimenez, I. & Puentes, V. Instability of cationic gold nanoparticle bioconjugates: The role of citrate ions (Journal of the American Chemical Society (2009) 131 (13320-13327)). *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 5322 (2010).
 79. Sumbayev, V. V. *et al.* Gold nanoparticles downregulate interleukin-1 β -induced pro-inflammatory responses. *Small* **9**, 472–477 (2013).
 80. Khan, M. A. & Khan, M. J. Nano-gold displayed anti-inflammatory property via

- NF- κ B pathways by suppressing COX-2 activity. *Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol.* **46**, 1149–1158 (2018).
81. Haupenthal, D. P. dos S. *et al.* Effects of chronic treatment with gold nanoparticles on inflammatory responses and oxidative stress in Mdx mice. *J. Drug Target.* **28**, 46–54 (2020).
 82. BarathManiKanth, S. *et al.* Anti-oxidant effect of gold nanoparticles restrains hyperglycemic conditions in diabetic mice. *J. Nanobiotechnology* **8**, 1–15 (2010).
 83. Larsen, A. *et al.* Gold ions bio-released from metallic gold particles reduce inflammation and apoptosis and increase the regenerative responses in focal brain injury. *Histochem. Cell Biol.* **130**, 681–692 (2008).
 84. dos Santos Haupenthal, D. P. *et al.* Effects of treatment with gold nanoparticles in a model of acute pulmonary inflammation induced by lipopolysaccharide. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **108**, 103–115 (2020).
 85. Mingorance, C., Rodríguez-Rodríguez, R., Justo, M. L., de Sotomayor, M. Á. & Herrera, M. D. Critical update for the clinical use of L-carnitine analogs in cardiometabolic disorders. *Vasc. Health Risk Manag.* **7**, 169–176 (2011).
 86. Rebouche, C. J. & Seim, H. Carnitine metabolism and its regulation in microorganisms and mammals. *Annu. Rev. Nutr.* **18**, 39–61 (1998).
 87. Vaz, F. M. & Wanders, R. J. A. Carnitine biosynthesis in mammals. *Biochem. J.* **361**, 417–429 (2002).
 88. Salic, K., Gart, E., Seidel, F., Verschuren, L. & Caspers, M. Combined Treatment with L-Carnitine and Nicotinamide Riboside Improves Hepatic Metabolism and Attenuates Obesity and Liver Steatosis. **20**, 1–19 (2019).
 89. Kerner, J. & Hoppel, C. Fatty acid import into mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1486**, 1–17 (2000).
 90. Indiveri, C. *et al.* The mitochondrial carnitine/acylcarnitine carrier: Function, structure and physiopathology. *Mol. Aspects Med.* **32**, 223–233 (2011).
 91. Console, L. *et al.* Carnitine Traffic in Cells. Link With Cancer. *Front. Cell Dev. Biol.* **8**, 1–16 (2020).
 92. Noland, R. C. *et al.* Carnitine insufficiency caused by aging and overnutrition compromises mitochondrial performance and metabolic control. *J. Biol. Chem.* **284**, 22840–22852 (2009).
 93. Ringseis, R., Keller, J. & Eder, K. Role of carnitine in the regulation of glucose

- homeostasis and insulin sensitivity: Evidence from in vivo and in vitro studies with carnitine supplementation and carnitine deficiency. *Eur. J. Nutr.* **51**, 1–18 (2012).
94. Zhang, X. D. *et al.* Toxicologic effects of gold nanoparticles in vivo by different administration routes. *Int. J. Nanomedicine* **5**, 771–781 (2010).
 95. El-Kafoury, B. M. A., Ahmed, M. A., Hammouda, G. A., ElKady, A. H. & Lasheen, N. N. Possible role of l-carnitine in improvement of metabolic and hepatic changes in hyperuricemic and hyperuricemic—Fructose-supplemented rats. *Physiol. Rep.* **7**, 1–14 (2019).
 96. Ringseis, R., Keller, J. & Eder, K. Mechanisms underlying the anti-wasting effect of l-carnitine supplementation under pathologic conditions: Evidence from experimental and clinical studies. *Eur. J. Nutr.* **52**, 1421–1442 (2013).
 97. Turkevich, J., Stevenson, P. C. & Hillier, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discuss. Faraday Soc.* **11**, 55–75 (1951).
 98. Cahova, M. *et al.* Carnitine supplementation alleviates lipid metabolism derangements and protects against oxidative stress in non-obese hereditary hypertriglyceridemic rats. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* **40**, 280–291 (2015).
 99. LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. & RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265–275 (1951).
 100. Draper, H. H. & Hadley, M. Malondialdehyde determination as index of lipid Peroxidation. *Methods Enzymol.* **186**, 421–431 (1990).
 101. Levine, R. L., Williams, J. A., Stadtman, E. P. & Shacter, E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* **233**, 346–357 (1994).
 102. Bannister, J. V & Calabrese, L. Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem. Anal.* **32**, 279–312 (1987).
 103. Aebi, H. [13] Catalase in Vitro. *Methods Enzymol.* **105**, 121–126 (1984).

ANEXOS

ANEXO A- Parecer Aprovação do Comissão de Ética no Uso de Animais



Pró Reitoria Acadêmica - PROAC
Comissão de Ética no Uso de Animais (Res. CONSUN 46/2009)

Palhoça, 30 de março de 2021

Registro na CEUA Nº 21.008.4.01.IV

Ao Pesquisador/Professor(a): Gislaine Tezza Rezin

Prezado(a),

Vimos por meio deste, certificar que a proposta de estudo e/ou projeto de pesquisa intitulada "Avaliar os efeitos de nanopartículas de ouro associada a camitina em animais submetidos a obesidade induzida por dieta", registrada com o nº 21.008.4.01.IV, sob a responsabilidade de Gislaine Tezza Rezin - que envolve a manutenção ou utilização de modelos animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) desta Instituição, em reunião de 19 de abril de 2021.

A CEUA/UNISUL tem por finalidade cumprir e fazer cumprir, no âmbito da UNISUL e nos limites de suas atribuições, os dispostos na legislação Federal aplicável à criação, manutenção e a utilização de animais em atividades de ensino e de pesquisa, realizadas pelos corpos docente, discente e técnico-administrativo da UNISUL e pesquisadores de outras instituições, caracterizando-se a sua atuação como educativa, consultiva, de assessoria e fiscalização nas questões relativas à matéria, sob os aspectos: I - Ético; II - Legal: enquadramento na legislação vigente.

Gostaríamos de salientar que, embora aprovado, qualquer alteração dos procedimentos e metodologias que houver durante a realização do projeto em questão, deverá ser informada imediatamente à Comissão.

Atenciosamente,

Prof. Sandro Melim Sgrott