UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
MORGANA PRÁ

EFEITOS DO TRATAMENTO COM NANOPARTÍCULAS DE OURO NA ADIPOSIDADE, RESPOSTA INFLAMATÓRIA E PARÂMETROS BIOQUÍMICOS EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A OBESIDADE

Tubarão
2018

MORGANA PRÁ

EFEITOS DO TRATAMENTO COM NANOPARTÍCULAS DE OURO NA ADIPOSIDADE, RESPOSTA INFLAMATÓRIA E PARÂMETROS BIOQUÍMICOS EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A OBESIDADE

LINHA DE PESQUISA: NEUROCIÊNCIA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde para obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profª. Gislaine Tezza Rezin, Dra.

Co-orientador: Prof°. Marcos Marques da Silva Paula, Dr.

Tubarão

2018

Prá, Morgana, 1987-
P91 Efeitos do tratamento com nanopartículas de ouro na adiposidade, resposta inflamatória e parâmetros bioquímicos em camundongos submetidos à obesidade ; -- 2018.
87 f. : il. color. ; 30 cm

Orientadora : Profª. Dra. Gislaine Tezza Rezin.
Coorientador : Prof. Dr. Marcos Marques da Silva Paula.
Tese (doutorado)–Universidade do Sul de Santa Catarina, Tubarão, 2018.
Inclui bibliografias.

1. Obesidade. 2. Inflamação. 3. Estresse oxidativo. 4. Nanotecnologia. 5. Nanopartículas – Uso terapêutico. I. Rezin, Gislaine Tezza. II. Universidade do Sul de Santa Catarina – Doutorado em Ciências da Saúde. III. Título.

CDD (21. ed.) 616.398

Ficha catalográfica elaborada por Francielli Lourenço CRB 14/1435

UNISUL

UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - DOUTORADO

Título da Tese

Efeitos do tratamento com nanopartículas de ouro na adiposidade, resposta inflamatória e parâmetros bioquímicos em camundongos submetidos a obesidade

MORGANA PRÁ

AUTOR

Aprovada pela Banca Avaliadora de Defesa da Tese em 21 de agosto de 2018.

Doutora Gislaine Tezza Rezin (orientador) _____

Doutora Larissa de Souza Constantino (avaliador externo – UFSC) _____

Doutora Josiane Budni (avaliador externo – Unesc) _____

Doutora Fabrícia Cardoso Petronilho (avaliador interno – PPGCS) _____

Doutora Jucélia Jeremias Fortunato (avaliador interno - Unisul) _____

Professor Doutor Jefferson Traebert

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

Dedico esta tese aos anjos que tenho ao meu redor. Anjos existem e muitas vezes não possuem asas, então passamos a chamá-los de amigos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradecer a Deus, pelas oportunidades, e sem sua benção nada seria possível.

Agradeço à Coordenação de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por viabilizar a realização desta tese por meio da concessão da taxa de estudos pelo Programa de Suporte à Pós-Graduação de Instituições de Ensino Comunitárias (PROSUC).

Agradeço imensamente, à minha orientadora Gislaine Tezza Rezin, por toda dedicação, amor e conhecimento transmitido, e por ser o exemplo de profissional ao qual almejo me tornar.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (PPGCS) da Universidade do Sul de Santa Catarina (UNISUL), por todos os ensimamentos.

À secretaria do PPGCS da UNISUL, por todo apoio.

Ao professor Marcos Marques da Silva Paula, professoras Isabela Casagrande Jeremias e Gabriela Kozuchovski Ferreira por todo auxílio e ensinamento.

A todos alunos de iniciação científica, de mestrado e colegas de doutorado da UNISUL, em especial Aline Haas de Mello, Mariana Goldim e Janaina Mazon, pela parceria, incentivo e auxilio nos experimentos com os animais e nas análises bioquímicas.

Aos professores da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), que aceitaram parcerias para a realização de análises bioquímicas e aos alunos que as realizaram ou que me auxiliaram a realizá-las.

E aos animais que foram instrumentos para a realização deste estudo.

Por fim, agradeço a minha família, meu marido Pedro que esta sempre ao meu lado me incentivando a ir além e a minha mãe Cleusa e irmã Maysa que sempre estendem a mão e entendem minha ausência.

Eu não teria chegado até aqui sem a contribuição de cada um. Meu muito obrigada.

RESUMO

Introdução: A obesidade é uma epidemia mundial e sua fisiopatologia está relacionada a inflamação, estresse oxidativo e disfunção mitocondrial. Devido a carência de tratamentos, há necessidade de novas opções terapêuticas. Assim, as nanopartículas de ouro com propriedades anti-inflamátorias poderiam ser uma alternativa para o tratamento desta doença.

Objetivo: Avaliar os efeitos do tratamento com nanopartículas de ouro na adiposidade, resposta inflamatória e parâmetros bioquímicos em camundongos submetidos a obesidade.

Métodos: Foi sintetizando e caracterizado nanopartículas de ouro de 18nm, isoladas ou associadas a lecitina de soja, administradas intraperitonealmente em camundongos uma vez ao dia, única administração ou durante 14 dias. Vinte e quatro horas após a última administração os animais foram mortos, tiveram tecidos removidos para avaliação da concentração de nanopartículas de ouro e soro para avaliação de toxicidade hepática e renal. Após esta etapa, os camundongos foram submetidos a obesidade através de dieta normolipídica (controle) ou dieta hiperlipídica (obeso), e tratados com salina ou nanopartículas de ouro após 8 semanas, 1 vez ao dia, por 14 dias, até completar 10 semanas de experimento. Ao final, os animais foram mortos, o soro foi coletado para análise de glicose e perfil lipídico, e a gordura visceral e o cérebro foram removidos para análise inflamatória e bioquímica.

Resultados: Foi encontrado maior concentração de nanopartículas de ouro nos tecidos quando administradas isoladamente, e não houve dano hepático ou renal. Em camundongos obesos, a administração de nanopartículas de ouro não reduziu peso corporal e gordura visceral, mas reduziu a ingestão alimentar. Níveis de glicose foram revertidos, mas o perfil lipídico não foi alterado em nenhum dos grupos. As nanopartículas de ouro apresentaram efeito benéfico nos parâmetros de inflamação e estresse oxidativo, sem reverter a disfunção mitocondrial.

Conclusão: O uso de nanopartículas de ouro foi positivo por reduzir consumo alimentar, quadro inflamatório e estresse oxidativo, e disponta como uma possível promessa no tratamento da obesidade.

Descritores: Obesidade. Inflamação. Estresse oxidativo. Nanotecnologia. Nanopartículas de ouro.

ABSTRACT

Introduction: Obesity is a worldwide epidemic and its pathophysiology is related to inflammation, oxidative stress and mitochondrial dysfunction. Due to the lack of treatments, there is a need for new therapeutic options. Thus, gold nanoparticles with anti-inflammatory properties could be an alternative for the treatment of this disease.

Objective: To evaluate the effects of gold nanoparticle treatment on adiposity, inflammatory response and biochemical parameters in mice submitted to obesity.

Methods: It was synthesized and characterized gold nanoparticles of 18nm, isolated or associated with soy lecithin, administered intraperitoneally in mice once daily, single administration or for 14 days. Twenty-four hours after the last administration the animals were killed, tissues removed for evaluation of gold and serum nanoparticle concentration for hepatic and renal toxicity evaluation. After this step, the mice were submitted to obesity through a normolipid diet (control) or hyperlipid diet (obese), and treated with saline or gold nanoparticles after 8 weeks, once a day for 14 days, until completing 10 weeks of experiment. At the end, the animals were killed, serum was collected for glucose and lipid profile analysis, and the visceral fat and brain were removed for inflammatory and biochemical analysis.

Results: A higher concentration of gold nanoparticles was found in the tissues when administered alone, and there was no hepatic or renal damage. In obese mice, administration of gold nanoparticles did not reduce body weight and visceral fat, but reduced food intake. Glucose levels were reversed, but the lipid profile was not altered in any of the groups. The gold nanoparticles presented a beneficial effect on the parameters of inflammation and oxidative stress, without reversing mitochondrial dysfunction.

Conclusion: The use of gold nanoparticles was positive for reducing food consumption, inflammatory conditions and oxidative stress, and provides as a possible promise in the treatment of obesity.

Keywords: Obesity. Inflammation. Oxidative stress. Nanotechnology. Gold nanoparticles.

LISTAS

Lista de abreviaturas

2,6-DCIP – 2,6-dicloroindofenol (do inglês *2,6-dichloroindophenol*)

DCFH-DA - 2,7 diaceto de diclorofluoresceína

$-NH_2$ – Grupos amina

ADP – Adenosina disfofato

AGRP – Proteína relacionada ao gene agouti (do inglês *agouti-related protein*)

ALT – Alanina aminotransferase

ANOVA – Análise de variância de uma via

ATP - Adenosina trifosfato

ARC - Núcleo arqueado

CAT – Catalase

CART – Transcrito regulado por cocaína e anfetamina (do inglês *cocaine and amphetamine-regulated transcritp)*

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CK – Creatina quinase

CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

DNA – Ácido desoxirribonucleico (do inglês *deoxyribonucleic acid)*

DMN – Núcleo dorsomedial

DRX – Difratometria de raios-x

EAA – Espectrometria de absorção atômica

ERO – Espécie reativa de oxigênio

FADH – Flavina adenina dinucleotídeo

$FADH_2$ – Flavina adenina dinucleotídeo reduzida

GABA – Acido gama-aminobutírico

GPx – Glutationa peroxidase

GNPs – Nanopartículas de ouro (do inglês G*old nanoparticle)*

GR – Glutationa redutase

GSH – Glutationa reduzida

GSSG – Glutationa

H_2O_2 – Peróxido de hidrogênio

HDL - Lipoproteínas de alta densidade *(do inglês High Density Lipoproteins)*

IASO – Associação Internacional para o estudo de obesidade (do inglês *International association for study of obesity)*

IL – Interleucinas

IKK – Inibidores de κkinase

LDL - Lipoproteínas de baixa densidade (do inglês *Low Density Lipoproteins*)

LHA – Area hipotalâmica lateral

LRb – Receptores hipotalâmicos de isoformas longas

IMC – Índice de massa corporal

JNK – c-Jun N-terminal quinase (do inglês c-Jun N-terminal Kinases)

MDA – Malondealdeido

NADH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo

NFk-B – Fator nuclear kappa B (do inglês *nuclear factor-kappaB*)

NPY – Neuropeptídeo Y (do inglês neuropeptide Y)

$O_2^{\cdot}$ – Anion superóxido

OH^- – Radical hidroxil

OMS – Organização Mundial de Saúde

POMC – Proopiomelanocortina

SOD – Superoxido dismutase

SPR – Superfície de banda ressonante

SNC – Sistema Nervoso Central

PKR – Proteína quinase R

PVN – Núcleo paraventricular

RNA– Ácido ribonucleico (do inglês *Ribonucleic acid)*

TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (do inglês *thiobarbituric acid reactive substances)*

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

TNF-αR – Receptor de fator de necrose tumoral alfa (do inglês *Tumoral necrosis fator alpha)*

TRL – Receptor *toll-like*

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

UNISUL – Universidade do Sul de Santa Catarina

UV-VISÍVEL – Ultra violeta visível

VIGITEL – Vigilância de fatores de ricos e proteção para doenças crônicas

VMN - Núcleo ventromedial

Lista de quadros

Quadro 1 – Composição e valor calórico das dietas utilizadas 41
Quadro 2 - Percentual de macronutrientes das dietas utilizadas 41
Quadro 3 – Quantificação de GNPs e GNPs + Lecitina de soja nos tecidos 52

Lista de figuras

Figura 01 - Esquema simplificado da inflamação do tecido adiposo e seus efeitos 20
Figura 02 - Via inflamatória das Quinases 21
Figura 03 – Marcadores inflamatórios em diferentes àreas do SNC presentes na obesidade 22
Figura 04 – Ação dos neurônios orexígenos e anorexígenos 23
Figura 05 – Relação entre metabolismo energético e estresse oxidativo 25
Figura 06 - Cadeia Respiratória Mitocondrial 27
Figura 07 - Escala nanométrica 29
Figura 08 - Estrutura química da Lecitina de soja 32
Figura 09 - Desenho do estudo parte I 39
Figura 10 - Desenho do estudo parte II 44
Figura 11 - Espectro eletrônico de uma solução de GNPs e GNPs associada a lecitina de soja 49
Figura 12 - Imagem representativa de uma análise de microscopia eletrônica de transmissão de GNPs modificados por lecitina de soja (300 kV) 50
Figura 13 - Histograma mostrando a distribuição do tamanho de partícula de GNPs modificados pela lecitina de soja 51
Figura 14 - Avaliação da ALT após administração de GNPs isoladas ou associadas a Lecitina de soja de soja por 24 horas e 14 dias 53
Figura 15 - Avaliação da creatinina após administração de GNPs isoladas ou associadas a Lecitina de soja por por 24 horas e 14 dias 53
Figura 16 – Efeito da administração de GNPs no consumo alimentar de camundongos submetidos a obesidade 55
Figura 17 – Acompanhamento do peso corporal de camundongos submetidos à obesidade e tratados com GNPs 56

Figura 18 - Efeito da administração de GNPs no peso da gordura visceral, mesentérica, epididimal e retroperitonial de camundongos submetidos a obesidade 57
Figura 19 – Efeito da administração de GNPs nos níveis de glicose, colesterol total, triglicerídeos, LDL e HDL em camundongos submetidos a obesidade 58
Figura 20 - Efeito da administração de GNPs sobre parâmetros inflamatórios na gordura mesentérica e estruturas cerebrais de camundongos submetidos a obesidade 60
Figura 21 - Ilustração sobre os possíveis mecanismos de ação das GNPs 61
Figura 22- Efeito da administração de GNPs sobre dano oxidativo na gordura mesentérica e estruturas cerebrais de camundongos submetidos a obesidade ... 63
Figura 23- Efeito da administração de GNPs sobre a atividade antioxidante da SOD e GSH na gordura mesentéroca e estruturas cerebrais de camundongos submetidos a obesidade 65
Figura 24 - Efeito da administração de GNPs sobre a atividade do complexo I e II da cadeia respiratório mitocondrial na gordura mesentérica e estruturas cerebrais de camundongos submetidos a obesidade 67

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 14
1.1 REFERENCIAL TEÓRICO 16
1.1.1 Obesidade 16
1.1.2 Fisiopatologia da obesidade 18
1.1.2.1 Inflamação na obesidade 19
1.1.2.2 Estresse oxidativo 24
1.1.2.3 Metabolismo energético 26
1.1.3 Tratamento da Obesidade 28
1.1.3.1 Nanotecnologia 29
1.1.3.1.1 Nanopartículas de ouro 30
1.1.3.2 Lecitina de soja 31
2. OBJETIVOS 33
2.1 OBJETIVO GERAL 33
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS PARTE I 33
2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS PARTE II 33
3. ETAPAS METODOLÓGICAS 35
3.1 TIPO DE ESTUDO 35
3.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS 35
3.3 ASPECTOS ÉTICOS 35
3.4 LOCAL DE REALIZAÇÃO 35
3.5 SÍNTESE DAS NANOPARTICULAS DE OURO 36
3.6 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTICULAS DE OURO 36
3.7 ASSOCIAÇÃO DAS NANOPARTICULAS DE OURO COM LECITINA DE SOJA 37
3.8 DESENHO EXPERIMENTAL 38
3.9 COLETA DE SANGUE E REMOÇÃO DOS TECIDOS 433
3.10 ANÁLISES LABORATORIAIS PARTE I 444
3.10.1 Quantificação da concentração das nanopartículas de ouro nos tecidos 444
3.10.2 Avaliação de toxicidade 444
3.11 ANÁLISES LABORATORIAIS PARTE II 455

3.11.1 Avaliação dos níveis de glicose, triglicerídeos, colesterol total, HDL e LDL 455
3.11.2 Parâmetros de inflamação.....455
3.11.3 Parâmetros de dano oxidativo 455
3.11.4 Atividade de enzimas antioxidantes.....466
3.11.5 Metabolismo energético 477
3.11.5.1 Atividade das enzimas da cadeia respiratória mitocondrial 477
3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA 477
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 488
5. CONCLUSÃO 70
REFERÊNCIAS.....711
APÊNDICES 86
APÊNDICE A – Primeiro artigo relativo à tese.....866
ANEXO 87
ANEXO A - Paracer de Aprovação da Comissão de Ética no uso de Animais 87

1. INTRODUÇÃO

A obesidade é considerada uma epidemia mundial, atingindo todos os ciclos da vida, diferentes grupos socioeconômicos e está presente em países desenvolvidos e em desenvolvimento. É caracterizada pelo acúmulo de gordura corporal, de tal forma que possa comprometer a saúde do indivíduo. O seu desenvolvimento está associado à fatores ambientais, genéticos, sociais, socioeconômicos e psicossociais, bem como as mudanças na disponibilidade e qualidade dos alimentos consumidos em muitos países, paralelo ao aumento do sedentarismo[1].

A fisiopatologia da obesidade ainda não está complemente descrita, mas estudos mostram que esta doença está relacionada com disfunções hormonais como a resistência a leptina, que atua no controle da saciedade, e a insulina, que é responsável pelo metabolismo de glicose[2,3]. Além disso, estudos mostram relação da obesidade com a presença de quadro inflamatório[4,5,6],estresse oxidativo[7,8,9] e disfunção mitocondrial[10], causados pelo consumo excessivo de nutrientes, principalmente gorduras saturadas[4,5,6]. Em nível celular, os nutrientes em excesso causam hipertrofia e hiperplasia de adipócitos, ativando vias inflamatórias através da liberação de citocinas, recrutamento de macrófagos, mastócitos e várias populações de células T, caracterizando uma inflamação sistêmica, prejudicando assim a função de células metabólicas e reduzindo ação da insulina e leptina[12].

A ativação destas vias também gera um quadro inflamatório no Sistema Nervoso Central (SNC) e altera funções em áreas como hipotálamo[6,13,14], hipocampo[15,16,17], córtex pré-frontal e estriado[18,19,20], podendo contribuir para o desenvolvimento de doenças neurológicas[21]. Neste sentido, a disfunção hipotalâmica ganha destaque em diferentes estudos[4,5,6], pois tem papel central na regulação da homeostase energética, integra múltiplos sinais em órgãos periféricos, modula o comportamento alimentar e metabolismo energético[14,22]. Além disso, alterações no hipocampo pode comprometer a cognição, memória, aprendizado e emoções[23,15], bem como alterações no córtex pré-frontal e estriado podem comprometer o sistema de recompensa[18,19]. Assim, alterações em suas funções podem resultar em perda do controle neural e, consequentemente, reduzir a saciedade e abrir espaço para o agravamento da obesidade[24].

Por ser multifatorial e associada a diferentes comorbidades, o tratamento da obesidade necessita de uma abordagem multidisciplinar. Neste sentido, o arsenal terapêutico para o tratamento desta doença é bastante limitado e duvidoso[25]. Um método bastante seguro é a associação de dieta balanceada com atividade física para a contínua perda de peso[26], mas em muitos casos, é necessário associar o uso de medicamentos ou outros tratamentos para acelerar este processo[27].

No cenário atual existe carência de tratamentos eficazes para controle da obesidade, evidenciando a importância de buscar novos alvos terapêuticos para essa doença. Pesquisas têm avaliado o efeito de medicamentos anti-inflamatórios na obesidade, como estudo retrospectivo de Boaz e colaboradores[28] que indicou que a exposição a aspirina e estatina em pacientes diabéticos duplica as chances destes perderem peso. Também, estudo de Van e colaboradores[11], que observou redução de prostaglandinas e fator de necrose tumoral α (TNF-α*)* após 9 dias de uso de diclofenaco 50mg em homens com sobrepeso e obesidade.

Neste sentido, a nanotecnologia se destaca como uma nova opção para diversos tratamentos na área da saúde, por exemplo, no transporte de fármacos ativos e imagens médicas[29]. Dentro da nanotecnologia, as nanopartículas de ouro (GNPs) possuem propriedades terapêuticas reconhecidas, principalmente em processos inflamatórios como lesões musculares[30] e artrites[31], reduzindo nestes casos marcadores inflamatórios[32], o que seria interessante para o tratamento da obesidade. Assim, estudo de Chen e colaboradores[32], avaliou o efeito anti-inflamatório e a distribuição de GNPs em camundongos adultos com peso adequado e constatou a inibição de citocinas pró-inflamatórias no tecido adiposo abdominal e acúmulo destas nanopartículas nos rins e fígado, mas sem danos celulares. Além disso, observaram redução da gordura retroperitoneal e mesentérica sem alterar o peso corporal.

O fato que a obesidade está associada a processos inflamatórios e que GNPs apresentam reconhecida ação anti-inflamatória e potencializadora da ação de outros fármacos, desperta interesse para o uso de GNPs em estudos envolvendo esta doença. Adicionalmente, é importante avaliar seu efeito sobre outros parâmetros bioquímicos relacionados direta e/ou indiretamente com a obesidade. Considerando que na obesidade existe inflamação no tecido adiposo, sugere-se avaliar efeitos das GNPs associadas à uma molécula lipossolúvel para facilitar sua chegada a este tecido. Desta forma optou-se por lecitina de soja, que contém em sua estrutura 60%

de fosfatídeos caracterizando sua propriedade lipofílica e seu poder de formar micelas imercíveis em gordura[33].

Por ser a obesidade uma doença de alta prevalência e de grande impacto para a saúde, com muitas lacunas na sua fisiopatologia e no seu tratamento, desperta o interesse e a necessidade de desenvolver novas formas de tratamento. Considerando estudos atuais que indicam um estado de inflamação e descontrole neural do comportamento alimentar, propõe-se avaliar o efeito anti-inflamatório de GNPs, investigando sua ação no tecido adiposo para redução da inflamação local e seus possíveis efeitos no SNC. Com isso, pretende-se contribuir para aprimoramento destas substâncias no tratamento da obesidade, bem como esclarecer parâmetros envolvidos nesta doença.

1.1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1.1 Obesidade

A obesidade é uma doença caracterizada pelo excesso de peso corporal sob a forma de gordura, que pode levar a graves complicações de saúde[1]. A quantidade e localização da gordura no corpo são fatores importantes a serem observados, pois estudos apontam que a gordura localizada superior e centralmente no corpo é mais comprometedora para a saúde, visto que ela pode desencadear doenças crônicas não transmissíveis[8,34].

O ganho de peso e gordura corporal, bem como consumo de dietas hiperlipídicas, podem alterar parâmetros bioquímicos como níveis de glicose, triglicerídeos[35], colesterol e suas frações, e estes são fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e diabetes, reduzindo desta forma a qualidade de vida de pessoas obesas[36,37]. Além disso, a obesidade está associada a doenças respiratórias, músculo-esqueléticas, gastrointestinais e alguns tipos de câncer[1].

Os principais fatores relacionados com a causa da obesidade são as mudanças nos padrões de alimentação e atividade física das últimas décadas, como o consumo excessivo de alimentos e o sedentarismo[1]. Também tem sido descrito que durante a adolescência os distúrbios nutricionais são as principais causas de obesidade, e na fase adulta são os fatores ambientais os mais envolvidos no seu desenvolvimento.

Além disso, a presença de um ou mais obesos na família aumenta em até sete vezes a chance de o indivíduo desenvolver esta doença[2,7].

Para diagnóstico de obesidade muitos métodos podem ser utilizados. Atualmente os métodos mais seguros e eficazes são técnicas de imagem, tais como ultrassonografia, ressonância magnética e tomografia computadorizada, mas o alto custo limita o uso dessas técnicas na prática clínica. Assim, alternativas com custo acessível são as mais comumente utilizadas e também podem diferenciar peso total de gordura corporal, entre elas, as medidas das pregas cutâneas e análise de bioimpedância são as técnicas mais utilizadas[25].

Nos serviços públicos de saúde os métodos mais completos de avaliação física ainda não estão disponíveis e índices mais simples são rotineiramente utilizados, e uma forma de reduzir os vieses de avaliação é associação de métodos entre si, como circunferência abdominal e índice de massa corporal (IMC). Medidas da circunferência maior que 102 cm para homens e 88 cm para as mulheres são considerados, anormalmente, altos e alertam sobre o risco para a saúde dos indivíduos[7,8,34], bem como o IMC maior que 30 kg/m^2 [1].

A Associação Internacional para o Estudo da Obesidade (IASO*)* relata que esta doença é considerada uma epidemia. Sendo reconhecida como um dos mais importantes problemas de saúde pública que o mundo enfrenta, gerando encargos financeiros e sociais em toda sociedade[38], pois está relacionada com o desenvolvimento de diversas outras doenças. E estima-se que no mínimo 2,8 milhões de adultos morrem a cada ano como resultado do excesso de peso ou obesidade[1].

Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) demostraram que em 2016 havia mais de 1,9 bilhão de adultos com sobrepeso, e destes 650 milhões eram obesos. Ainda 41 milhões de crianças menores de 5 anos estavam acima do peso ou obesas[1]. Entre os países do continente Americano, os Estados Unidos possui o maior índice de obesidade na população adulta com 36,2% e na América do Sul o maior índice está na Argentina, sendo 28,3%[1].

No Brasil, o programa de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (VIGITEL) mostrou que em 2016 haviam 53,8% dos indivíduos com excesso de peso, sendo 57,7% dos homens e 50,5% das mulheres, e que 18,9% dos adultos estavam obesos, sendo 18,1% dos homens e 19,6% das mulheres. Dentre as capitais brasileiras, Rio Branco apresentou os maiores índices de sobrepeso e obesidade do país, e na região Sul destaca-se Porto Alegre

com 19,9% dos adultos obesos e 54,9% dos adultos com sobrepeso, Curitiba com 18,9% e 54,2% e Florianópolis com 14,5% e 48,8%, respectivamente[39].

1.1.2 Fisiopatologia da obesidade

A OMS cita que a principal causa da obesidade e excesso de peso é um desequilíbrio no balanço energético, entre as calorias consumidas e as calorias gastas pelo indivíduo. Fato que ocorre devido às mudanças de padrões comportamentais da população como consumo alimentar rico em açúcares e gordura, bem como o aumento do sedentarismo[1].

O consumo de nutrientes bem como seu metabolismo são controlados por estruturas neurais, sistemas neuroquímicos e neuroendócrinos[40]. Após a ingestão alimentar, ocorre aumento da captação dos nutrientes da circulação para os tecidos, particularmente para os tecidos sensíveis à insulina, e durante o jejum o processo ocorre no sentido inverso. No entanto, na obesidade, esse fluxo bidirecional encontra-se alterado[41,42,43].

A obesidade também está relacionada com a regulação do tecido adiposo, que é um órgão multicelular, controlado por hormônios e com inúmeras funções, entre elas secreção de adipocinas que atuam sobre vários aspectos biológicos, incluindo homeostase energética e inflamação[41,44,45]. Neste contexto, insulina e leptina são hormônios secretados em proporção a quantidade de massa adiposa e atuam perifericamente estimulando o catabolismo[40].

O aumento dos ácidos graxos livres devido à grande ingestão alimentar e dos produtos secretados pelo tecido adiposo, contribui para o aparecimento da resistência à insulina. Essa condição caracteriza-se pela redução da ação biológica da insulina nas células-alvo e assim, há uma disfunção na captação, no metabolismo e no estoque de glicose, e alteração na sinalização de insulina nos tecidos-alvo e, nos adipócitos. Em consequência da menor captação de glicose, torna-se necessária uma maior produção de insulina pelo pâncreas para a manutenção dos níveis glicêmicos normais, aumentando, desta forma, os níveis circulantes deste hormônio. Entretanto, a situação de resistência à insulina é acompanhada de hiperinsulinemia[46].

Neste cenário, sabe-se que a insulina regula a produção de leptina no adipócito e os seus níveis circulantes correlacionam-se com a massa de tecido adiposo. Portanto, em indivíduos obesos, os níveis de leptina circulantes encontram-se

elevados[42]. Fisiologicamente, a leptina liga-se a receptores hipotalâmicos de isoforma longa (LRb) que mediam a sinalização intracelular[3,47], e transmitem informações relativas à massa do tecido adiposo e ao depósito energético corporal existente, suprimindo a ingestão alimentar, e contribuindo para o aumento do gasto de energia, além de colaborar, perifericamente, na redução da síntese e secreção de insulina[3,8]. Na obesidade, os altos níveis circulantes de leptina não induzem a resposta esperada de redução do consumo alimentar, pois sua sinalização nos neurônios responsáveis pelo comportamento alimentar, o neuropeptídeo Y (NPY) e o peptídeo relacionado ao gene *agouti* (AGRP), nos núcleos hipotalâmicos estão diminuídos, indicando que pessoas obesas são também resistentes à ação da leptina[3,48].

Outros sinalizadores metabólicos como adiponectina, hormônios intestinais e nutrientes funcionam como mediadores que interagem com regiões do SNC e, principalmente, do hipotálamo para modular o balanço energético periférico e central[49]. Assim, uma desregulação neuroendócrina favorece o desenvolvimento da obesidade, sendo o hipotálamo a chave da regulação energética e homeostase corporal[50,51].

Diferentes estudos indicam ainda que na obesidade existe aumento de interleucinas (IL) pró e anti-inflamatórias[13,52,53], bem como presença de estresse oxidativo[54,55,56], dano ao ácido desoxirribonucleico (DNA)[10,57] e diminuição na expressão de genes mitocondriais[58].

1.1.2.1 Inflamação na obesidade

O consumo excessivo de nutrientes causa hipertrofia e hiperplasia nos adipócitos, e assim altera funções do tecido adiposo, que além de depositar gordura, realiza outras funções como síntese e regulação hormonal. O depósito excessivo de gordura ativa vias envolvidas na resposta imune, liberando citocinas e recrutando células inflamatórias para este tecido[59], caracterizando um baixo grau de inflamação crônico[12,60]. Estudo de Buckman e colaboradores[59] avaliando ratos mostrou que o consumo de dieta com alto teor de gordura provoca hiperplasia nos adipócitos, recrutamento de macrófagos e células do sistema imune para o tecido adiposo. Ainda, foi verificado uma relação positiva entre o número de monócitos infiltrados no tecido adiposo com peso corporal, massa gorda, marcadores inflamatórios e posterior

recrutamento de células do sistema imune para o SNC. A figura 01 mostra um esquema simplificado de hipertrofia e hiperplasia dos adipócitos e seus efeitos.

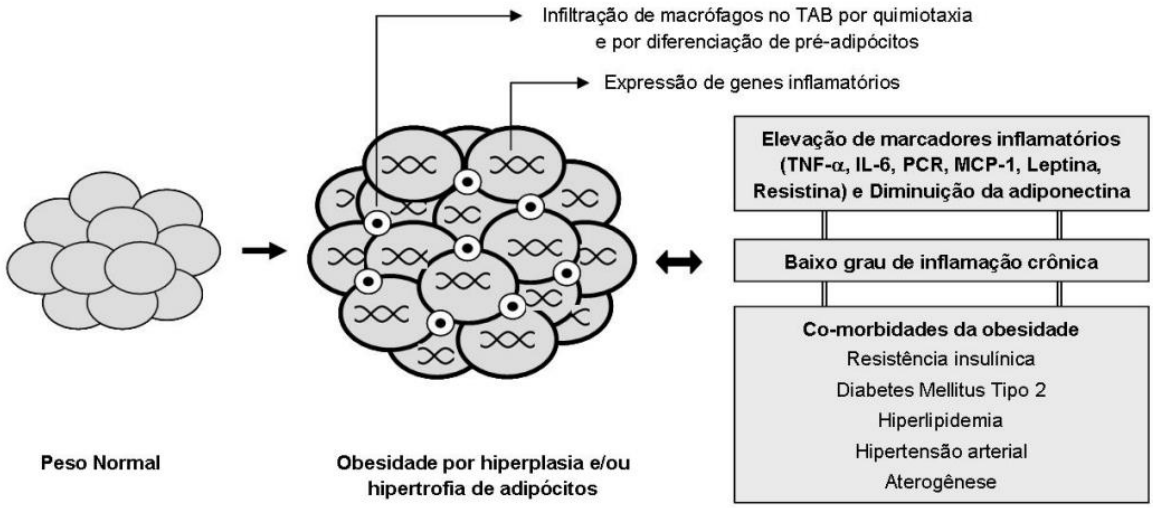

Figura 01 – Esquema simplificado da inflamação do tecido adiposo e seus efeitos. Diferença no tamanho e número de adipósitos entre indivíduos com peso normal e obesos, com quadro inflamatório em obesos, desenvolvido pelo excesso de nutrientes da dieta. IL-6: interleucina-6; MCP-1: monócito quimiotático de proteina-1; PCR: proteína c reativa; TAB: tecido adiposo branco; TNF-α: fator de necrose tumoral alpha.
Fonte: Leite, Rocha, Brandão-neto[61].

A nível celular os nutrientes consumidos em excesso sinalizam vias como c-Jun N-terminal quinases (JNKs), inibidores de quinase k (IKK) e proteína quinase R (PKR), que estão envolvidas no controle dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO), apoptose celular e neurodegeneração, através da ativação de citocinas como TNF-α e IL-1β ou receptores *toll-like* (TRL). Além disso, recruta agentes imunológicos como macrófagos, mastócitos e várias populações de células T, resultando em uma ativação pró-inflamatória (figura 02) e, consequentemente, inibição da função de células metabólicas, reduzindo taxa metabólica corporal[12].

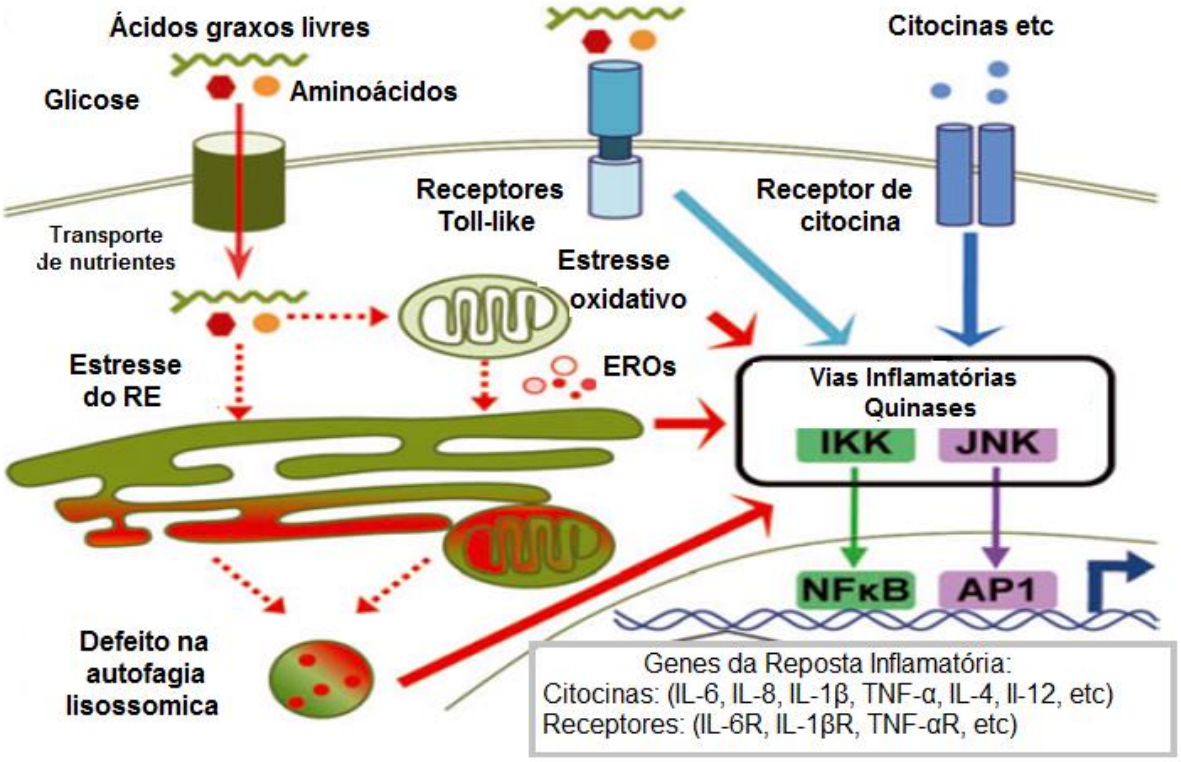

Figura 02 - Via inflamatória das Quinases. Ativação de via das quinases por excesso de nutrientes e, consequentemente, aumento de estresse oxidativo e quadro inflamatório. EROs: espécies reativas de oxigênio; IKK: Inibidores de quinase K do inglês inhibitor of k kinase; IL-1β: interleucina-1β; IL-4: interleucina-4; IL-6: interleucina-6; IL-8: interleucina-8; IL-12: interleucina-12; IL-6R: recepetor de interleucina 6, IL-1βR: receptor de interleucina 1β; JNK: C-Jun N terminal quinases do inglês C-Jun N-terminal kinase; TNF-α: fator de necrose tumoral alpha, TNF-αR: receptor de fator de necrose tumoral alpha; RE: etículo endoplasmático.
Fonte: Cai, Liu[62].

Assim, a obesidade induz inflamação em todo o organismo, com níveis aumentados de ácidos graxos circulantes, mediadores inflamatórios, e ainda endotoxinas como o LPS, resultando em uma alteração da homeostase de muitos orgãos, inclusive no SNC, que pode ser afetado por diferentes vias, através do nervo vago, barreira hemoencefálica e plexo córoide[21]. Estudos recentes tem demonstrado quadro de inflamação neural relacionado a obesidade, e que a inflamação está presente em diferentes partes do SNC, conforme figura 03[21,62,63].

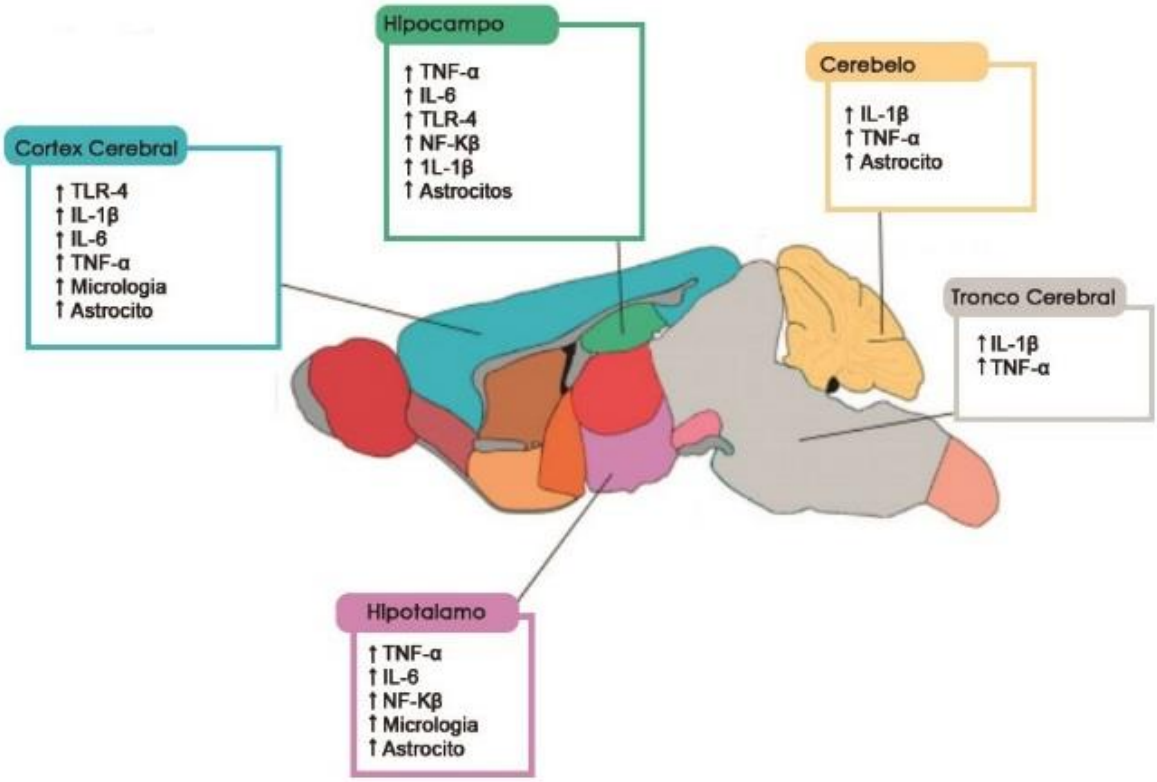

Figura 03 - Marcadores inflamatórios em diferentes áreas do SNC presentes na obesidade. Marcadores inflamatórios envolvidos no quadro de inflamação em modelos animais induzidos a obesidade induzida por dieta, com aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias e ativação de micróglias e astrocitos.
Fonte: Adaptado de Guillemot e Muccioli[21].

Um estudo realizado por Van e colaboradores[63], comparou marcadores inflamatórios de indivíduos obesos que seriam submetidos a cirurgia bariátrica e indivíduos com peso adequado, e observou em amostras de sangue que existe níveis mais elevados de TNF-α, IL-1β e IL-6 em indivíduos obesos quando comparados com indivíduos de peso adequado, e que após a cirurgia estes marcadores diminuem, evidenciando quadro inflamatório relacionado à obesidade. No líquido cefaloraquidiano foi observado que indivíduos obesos apresentam aumento dos níveis dos de marcadores inflamatórios como IL-6, e que após cirurgia bariátrica ocorre aumento dos nívéis de marcadores anti-inflamatórios como IL-10. Também foi avaliado atividade cerebral por ressonância magnética funcional e identificado que a atividade neural após ingestão de glicose de indivíduos obesos é menor que a atividade neural de indivíduos com peso adequado[63].

Alterações estruturais do SNC também foram relatas em estudos envolvendo obesos, como alteração de volume total e de substancia cinzenta[64,65]. Estas

alterações são associadas a presença de inflamação em diferentes áreas do SNC que podem desencadear deficiências cognitvas, déficit de memória, alterações do centro da saciedade e sistema de recompensa[21,66].

Neste sentido, o hipotálamo é uma área do encéfalo que está em evidência devido suas funções no controle do sistema hormonal e ingestão alimentar[67]. É formado por núcleo arqueado (ARC), núcleo paraventricular (PVN), área hipotalâmica lateral (LHA), núcleo dorsomedial (DMN) e núcleo ventromedial (VMN)[68]. O ARC é a área que está envolvida no controle da homeostase energética[69], onde atuam principalmente dois subgrupos de neurônios oréxigenos, NPY e AGRP, e neurônios anorexígenos proopiomelanocortina (POMC) e transcrito regulado por cocaína-anfetamina (CART)[70]. Os neurônios anorexígenos e orexígenos tem funções fisiológicas opostas, são capazes de identificar sinais periféricos como leptina, insulina e grelina, e também sinais centrais como o ácido gama-aminobutírico (GABA), serotonina e melanocortina, desta forma, modulam neuropeptídeos e neurotransmissores que regulam o apetite, gasto calórico e metabolismo, sendo assim, o hipotálamo é chamado de centro da saciedade[68] (figura 04).

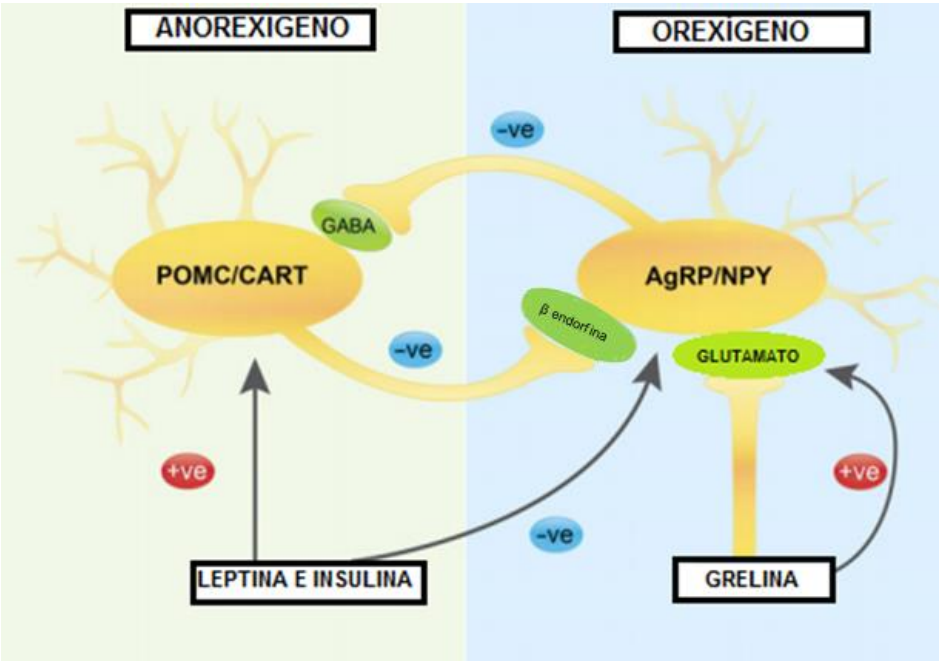

Figura 04 - Ação dos neurônios orexígenos e anorexígenos. Ação de hormonios nos neurônios hipotalâmicos que resulta no controle da saciedade. Dente eles a ação da leptina que regula ingesta e gasto energético, insulina que atua na regulação do estoque e metabolismo de glicose e grelina que que induz sensação de fome e assim aumenta apetite. AgRP: agouti-related peptide; CART:

cocaine and amphetamine-regulated transcript; GABA: g-aminobutyric acid; NPY: neuropeptide Y; POMC: proopiomelanocortin.
Fonte: Willians[14].

Estudo de Gupta[71] observou em cultura de astrócitos de ratos a ação de ácidos graxos saturados e insaturado, e encontrou aumento dos níveis de TNF-α e IL-6 quando administrado ácidos graxos saturados, e após administração de ácidos graxos insaturados houve redução destes marcadores. Desta forma, evidencia-se que ácidos graxos saturados estão envolvidos na gênese de inflamação e ácidos graxos insaturados podem exercer papel anti-inflamatório.

Milanski e colaboradores[5] avaliaram ratos alimentados com ração padrão comparando com ratos que receberam ração hiperlipídica e observaram que ácidos graxos saturados ativam receptores TLR2 e TLR4 no hipotálamo. Desta forma, pode ocorrer aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias e, consequentemente, sinalizar vias que comprometem o controle do apetite nos neurônios hipotalâmicos.

A sinalização de citocinas pro-inflamatórias como TNF-α, IL-1β e IL-6 aumentam a atividade de NADPH oxidase e os níveis de anion superóxido(O_2)[72,73], bem como o excesso de nutrientes ingeridos na alimentação leva ao aumento na produção de ERO, além de diminuir a capacidade antioxidante fisiológica[74], gerando estresse oxidativo na obesidade. Assim, configura-se um ciclo vicioso, onde a maior produção de EROS promove também o agravamento do estado inflamatório[75,76].

1.1.2.2 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre a produção e eliminação de EROs[77], entre elas O_2, peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxíla (OH·). A produção controlada de EROs pode atuar positivamente na resposta infecciosa, proliferação, diferenciação e sinalização celular. Entretanto um aumento anormal da sua produção, devido a fatores como ingestão calórica excessiva, inflamação ou redução da capacidade antioxidante do organismo, pode levar a alterações metabólicas[78].

A homeostase de EROs é mantida pelo sistema de defesa antioxidante endógeno, compreendendo enzimas como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutationa peroxidase (GPx), bem como sistema exógeno composto de

vitaminas, carotenóides, polifenóis e oligoelementos como selênio e zinco[78]. A defesa antioxidante atua através de mecanismos de prevenção, impedindo e/ou controlando a formação de radicais livres e espécies não-radicalares, evitando assim a ocorrência de danos oxidativos[79].

Desse modo, a formação de radicais livres ou EROs deve-se ao fato do oxigênio sofrer redução monovalente, o que permite a geração de moléculas ou íons reativos durante o processo de redução[80]. Sendo assim, o oxigênio é, primeiramente, reduzido a O_2^-. Em seguida, a enzima SOD reduz o O_2^- a H_2O_2. Uma vez que o H_2O_2 é formado, esse deve ser reduzido à H_2O para evitar a formação do $OH^{\cdot}$ pela reação de Fenton ou de Haber-Weiss. Uma das enzimas capaz de reduzir o H_2O_2 é a CAT. A GPx também consegue eliminar o H_2O_2 pelo acoplamento da sua redução à H_2O com a oxidação da glutationa reduzida (GSH). O produto dessa reação, glutationa oxidada (GSSG), consiste de duas GSH ligadas por uma ponte dissufeto, e pode ser convertido novamente a GSH reduzida pela enzima glutationa redutase (GR)[81,82,83], conforme figura 05.

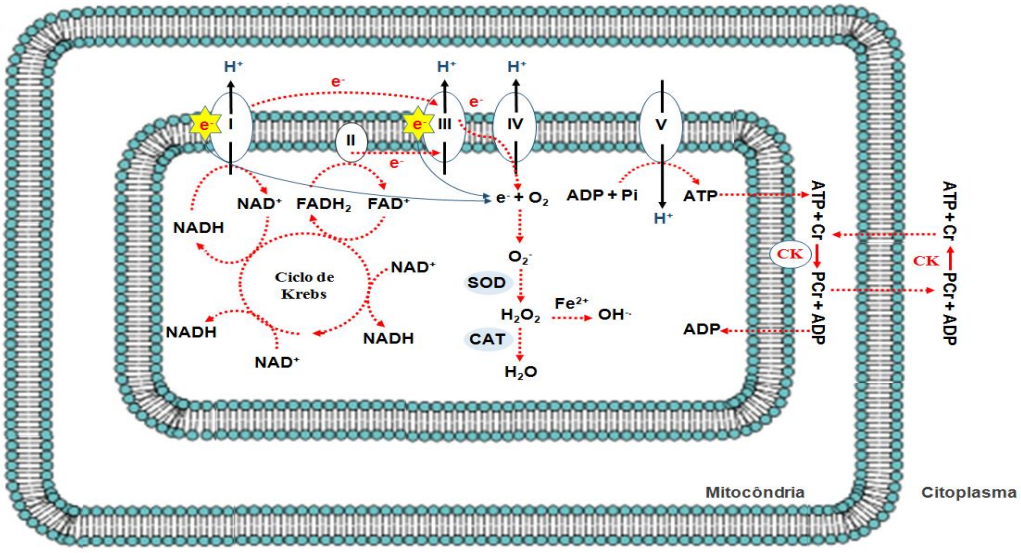

Figura 05 - Relação entre metabolismo energético e estresse oxidativo. Dentro da mitocôndria e durante o metabolismo energético normal existe formação de EROs e as enzimas antioxidantes atuam na sua redução evitando estresse oxidativo celular. ADP: adenosina difosfato; ATP: adenosina trifosfato; C: citocromo c; CAT: catalase; CK: creatina quinase; Cr: creatina; e^-: elétrons; $FADH_2$: flavina adenina dinucleotídeo reduzida; FAD: flavina adenina dinucleotídeo; H^+: íon hidrogênio; H_2O: água; NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida; NAD+: nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada O_2: oxigênio; PCr: transportadores de fosfato; Pi: fosfato, SOD: superóxido dismutase.

Fonte: Adaptado de Cardoso[84].

Indivíduos obesos apresentam estresse oxidativo, e este pode estar relacionado a redução da capacidade antioxidante[85,86], bem como devido a alterações no tecido adiposo com acúmulo excessivo de gordura onde a maior entrada de nutrientes pode ser responsável pelo aumento da produção de EROs devido a saturação da cadeia respiratória mitocondrial[87,88]. Estudo de Linnea e colaboradores[89] demonstra que dieta rica em gordura induz estresse oxidativo em nível cerebral, e acarreta disfunção do mesmo. Neste sentido, como a geração de EROs ocorre dentro da mitocôndria[90], pode levar a disfunção mitocondrial, conforme dados apresentados no estudo de Ma e colaboradores[91] que identificaram dano oxidativo e disfunção mitocondrial no plasma e no cérebro (tecido cerebral total, sem divisão de estruturas cerebrais) de ratos com obesidade induzida por dieta rica em gordura.

1.1.2.3 Metabolismo energético

A glicose é a principal fonte de energia utilizada pela maioria das células e ocupa uma posição central no metabolismo energético, visto que fornece o substrato para ativar o ciclo de Krebs[92,93,94] e, consequentemente, a cadeia respiratória mitocondrial[95] que leva a produção de adenosina trifosfato (ATP)[92,96]. A ação combinada do ciclo de Krebs e da cadeia respiratória mitocondrial gera grande parte do ATP necessário para as células[93]. Sabe-se que a cadeia respiratória mitocondrial fornece em torno de 95% de todo o ATP sintetizado, e que a mitocôndria é a organela intracelular que mantém os suprimentos de energia. Diante disso, aderido às cristas mitocondriais encontra-se uma grande quantidade de proteínas componentes da cadeia respiratória mitocondrial e a ATP sintase. Ainda, na matriz mitocondrial, localizam-se as enzimas do ciclo de Krebs[77,93].

A cadeia respiratória mitocondrial é um complexo enzimático responsável pela gradativa transferência de elétrons provenientes do metabolismo intermediário para a redução do oxigênio e síntese de ATP. Durante este processo, os elétrons provenientes das coenzimas nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH) e flavina adenina dinucleotídeo reduzida ($FADH_2$), reduzidas durante o ciclo de Krebs, são transferidas para os complexos I e II, respectivamente, e destes para os complexos III e IV de maneira gradativa, até o aceptor final de elétrons, o oxigênio molecular, com concomitante formação de água. A passagem de elétrons através dos complexos I, III e IV é acompanhada do bombeamento de prótons da matriz

mitocondrial para o espaço intermembranas. Este gradiente eletroquímico, responsável pela formação do potencial de membrana mitocondrial, dirige o fluxo de prótons de volta à matriz mitocondrial através da ATP sintase, que utiliza esta energia para a síntese de ATP[77], conforme ilustrado na figura 06.

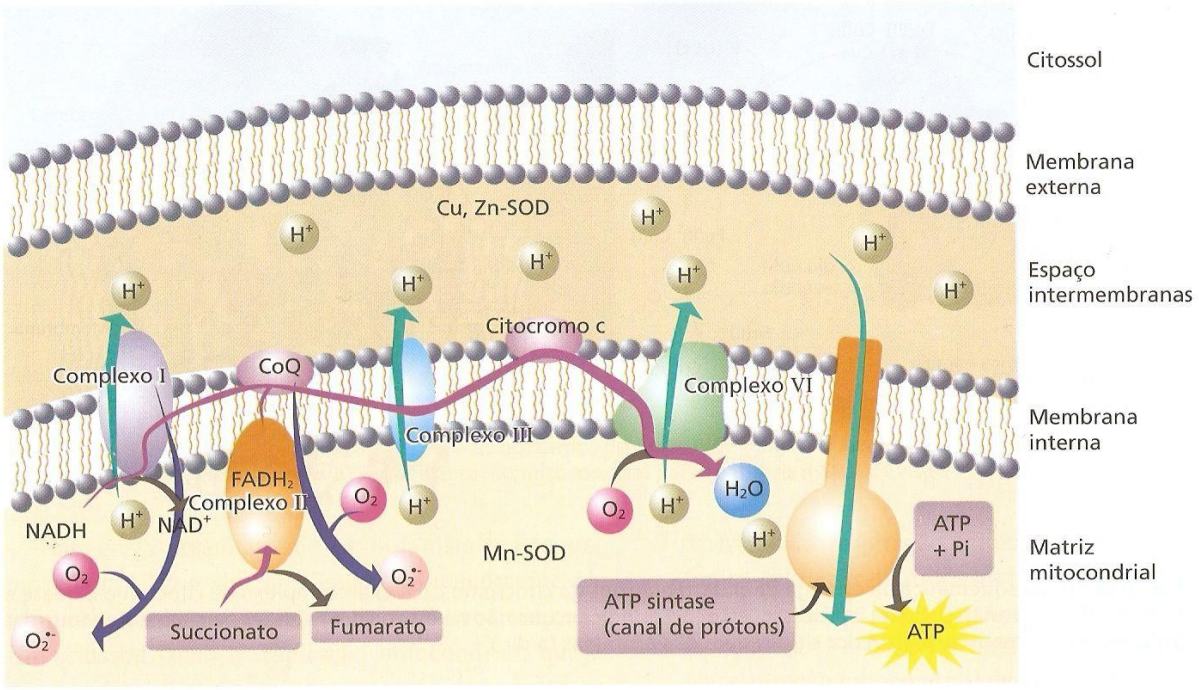

Figura 06 - Cadeia respiratória mitocondrial. Atividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial para síntese de ATP. ATP: adenosina trifosfato; CoQ: coenzima Q; Cu: cobre: $FADH_2$: flavina adenina dinucleotídeo reduzida; H^+: íon hidrogênio; H_2O: água; Mn-SOD: manganês com enzima super óxido dismutase; NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida; NAD+: nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada O_2: oxigênio; Pi: transportadores de fosfato; Zn-SOD: Zinco com enzima super óxido dismutase.
Fonte: Ohara[97].

Uma alteração funcional na mitocôndria pode levar, portanto, a alterações neuronais, pois uma redução no transporte de elétrons, além de causar um prejuízo na produção de ATP, leva a uma dispersão dos elétrons na forma de ERO potencialmente danosas às células[98]. Ainda, na obesidade, pode haver disfunção mitocondrial devido ao desequilíbrio entre armazenamento e gasto energético[99] e alterações epigenéticas também contribuem para desregulação da função mitocondrial e, consequentemente, do metabolismo energético[100].

O excesso de nutrientes da alimentação pode alterar a função mitocondrial em diferentes tecidos[101]. Neste sentido, estudo de Rong e colaboradores[102] mostrou que há redução da biogênese mitocondrial em roedores obesos. No músculo esquelético

já demonstrado redução da massa e função mitocondrial[103,104] e presença de estresse oxidativo[9] e no SNC ocorre a redução da expressão dos genes mitocondriais[10].

1.1.3 Tratamento da Obesidade

Partindo do princípio que a obesidade é uma doença multifatorial, torna-se fácil a compreensão da necessidade de uma abordagem multidisciplinar. Ainda, considerando os riscos relacionados à mesma, existe a necessidade de tratamento dos pacientes, principalmente daqueles com comorbidades associadas[25]. Contudo, o arsenal terapêutico para o tratamento da obesidade é bastante limitado e duvidoso. No Brasil, a Anvisa controla a utilização de medicamentos para tratamento da obesidade, entre eles: anfepramona, femproporex, mazindol, sibutramina[105], e recentemente liberou uso de um novo fármaco, a liraglutida[106]. No entanto, estes medicamentos são questionados quanto à sua eficácia e segurança[107], pois apresentam resultados satisfatórios na redução de peso em curto prazo mas insatisfatório por longos períodos, ocorrendo muitas vezes reganho de peso. Além do aparecimento de vários efeitos adversos, o qual dificulta muito o uso clínico desses fármacos[27,107].

Com base nisso, fica claro que o método mais seguro ainda é a associação de dieta balanceada com atividade física. Um estudo de revisão sobre métodos usados para perda de peso verificou que a combinação de dieta e atividade física favorece a contínua perda de peso[108]. Ainda, estudo qualitativo verificou através de respostas de indivíduos obesos a necessidade de orientação a longo prazo, associando dieta a prática de atividade física, onde os mesmos acreditam que desta forma seria mais fácil manter a perda de peso[109].

Além da problemática da obesidade, atualmente, o estereótipo de beleza e corpo magro gera um uso irracional e frequente de medicamentos para perda de peso, principalmente entre as mulheres[110]. De acordo com relatório da Junta Internacional de Fiscalização de Entorpecentes[111] houve um aumento de 500% de consumo destes medicamentos no Brasil desde 1998, citando ainda que o Brasil está entre os países com os maiores índices de consumo. Em 2010, a ABESO (Associação Brasileira para Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica) fez um alerta ao uso *off label* de medicamentos como alternativa para perda de peso, citando que devido à falta de

opções medicamentosas para o tratamento da obesidade, alguns médicos indicam medicamentos ainda não aprovados para esta finalidade[112].

1.1.3.1 Nanotecnologia

A nanotecnologia é um campo de estudo que procura criar estruturas através de rearranjo dos átomos de modo que formem materiais e sistemas, cujas estruturas e componentes melhoram significativamente suas propriedades, devido à sua dimensão nanométrica. Trata-se de uma área interdisciplinar que utiliza diversos materiais (polímeros, cerâmicas, metais, biomateriais) e explora propriedades e fenômenos desenvolvidos em escala nanométrica (entre 0,1 a 100 nm de diâmetro)[113,114].

O termo “nano” vem do grego e significa “anão”, é utilizado como um prefixo para algo diferente de uma unidade de medida, como em "nanociência", e está relacionado a escala dos nanômetros[114], conforme figura 07. As nanopartículas podem ser divididas em orgânicas e inorgânicas, sendo os componentes celulares e os vírus bons exemplos de nanopartículas orgânicas[115]. Cabe as nanopartículas inorgânicas a classe dos nanomateriais, incluindo aquelas baseadas em óxidos metálicos (óxido de ferro, óxido de cério, dióxido de titânio, dióxido de silício, entre outros) e metais (cobre, níquel, ouro e prata), possuindo uma escala de comprimento no intervalo nanométrico[116].

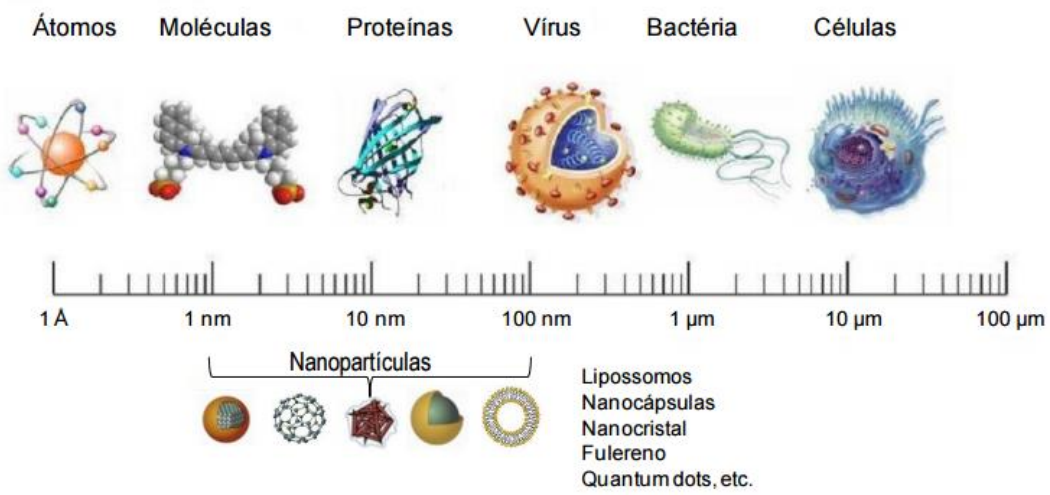

Figura 07 - Escala manométrica. Comparação do tamanho nanométrico da nanoparticulas com outros microorganismos.

Fonte: adaptado de Anvisa[114].

A partir dos anos 90 houve um grande aumento na utilização das nanopartículas, tanto na indústria como na área da saúde, e um incremento na implementação das tecnologias, produção de diversos tipos de nanomateriais,[102,103] bem como na expansão de pesquisas em relação ao potencial de aplicações nanotecnológicas em vários domínios, tais como fotônica, catálise, magnetismo e biotecnologia, incluindo cosméticos, produtos farmacêuticos, medicamentos, nanomateriais como transportadores de fármacos ativos e imagens médicas[29,114]. No Brasil existem 608 empresas usando nanopartículas e 108 empresas que as desenvolvem, sendo as principais áreas de utilização a indústria química, petroquímica e saúde[114].

A pequena dimensão das nanopartículas permite entrar facilmente e atravessar os tecidos, células e organelas, visto que, seu tamanho é semelhante ao de muitas biomoléculas. Assim, embora forneça diversos benefícios para indústria e potencial para utilização em diferentes tratamentos de saúde, a utilização de nanopartículas deve ser feita com cautela, pois além de sua facilidade de penetração nas células, existe uma grande reatividade devido ao seu pequeno tamanho, sendo necessário cuidado na sua utilização, observando seu potencial acumulativo e tóxico[113,117].

1.1.3.1.1 Nanopartículas de ouro

As GNPs são um dos nanomateriais mais utilizados na biomedicina[118,119] e são capazes de se ligar a pequenas e grandes biomoléculas, sendo que a penetração destas nanopartículas em membranas celulares é facilitada por sua escala nanométrica, podendo ter muitas finalidades nas aplicações biomédicas. Em particular, as GNPs têm aplicações em diagnóstico e tratamento do câncer e entrega de farmácos[29], bem como, o ouro coloidal e alguns dos seus compostos têm propriedades terapêuticas reconhecidas, especialmente para o tratamento de processos inflamatórios e artrites[119].

Estudos têm demonstrado ação anti-inflamatória de GNPs no tratamento de lesão muscular[30] em modelo animal e ainda que a administração tópica de GNPs diminui a inflamação intra-ocular e danos oxidativos em um processo inflamatório ocular induzida por LPS interferindo no caminho do receptor do tipo *toll* 4 e do NFκ-B[120]. Estudo de Victor e colaboradores[30] avaliou efeito de ultrassom pulsado em lesão

muscular associado a GNPs de 25nm, e observou redução de marcadores inflamatórios como TNF-α e IL-1β, bem como redução de marcadores de estresse oxidativo, como substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e ânion superóxido. Outro estudo, de Chen e colaboradores[32], mostrou que camundongos que receberam GNPs esféricas de 21 nm perderam gordura retroperitoneal e mesentérica sem alterar o peso corporal e o consumo energético, bem como tiveram acúmulo destas nanopartículas nos rins e fígado, e não foram observados danos celulares. Ainda neste, estudo foi observado inibição da expressão de citocinas pró-inflamatórias no tecido adiposo abdominal.

Para o tratamento da inflamação na obesidade as GNPs poderiam ser direcionadas para tecidos com maior grau de inflamação, como tecido adiposo, e assim sugere-se associar a um agente facilitador. A lecitina de soja por ter característica lipofílica[33,121], poderia atuar como agente de revestimento das GNPs e priorizar o depósito deste nanomaterial no tecido adiposo.

1.1.3.2 Lecitina de soja

A lecitina extraída do grão da soja é uma mistura de fosfolipídeos, triglicerídeos e outras substâncias derivadas dos processos de refinamento do óleo[122], sendo composta de aproximadamente 60% de fosfatídeos (colina, etanolamina e inositol), 38% de óleo e 2% de umidade[123]. Possui componentes básicos para as funções energéticas e estruturais de todas as membranas biológicas[122]. Estudo de Marconcin[124], que realizou suplementação em cães, demonstrou diversos benefícios nutricionais e fisiológicos da lecitina, como regeneração hepática, percursão de mediadores químicos da inflamação como prostaglandinas e leucotrienos, solubilização e transporte de colesterol, bem como aumento da produção de sais biliares. Entretanto, sua maior utilização é como agente emulsificante e/ou estabilizante natural, principalmente em alimentos industrializados[125].

A lecitina de soja (figura 08) tem característica lipofílica e poder de formar micelas imercíveis em gordura[33]. Assim, desperta interesse em sua aplicação associada às moleculas biológicas deste estudo, para facilitar seu transporte ao tecido adiposo, tendo em sua estrutura grupos funcionais polares e que apresentam afinidade com GNPs, além de uma cadeia apolar, que confere lipossolubilidade[121]. Em

resumo, a lecitina pode ser um ótimo agente de revestimento de GNPs, permitindo que as mesmas possam se distribuir no tecido adiposo.

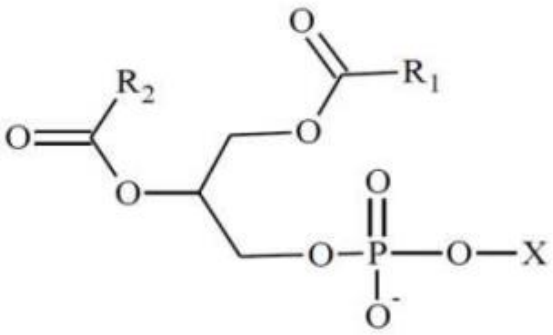

Figura 08 - Estrutura química da lecitina de soja. Lecitina de soja possui grupos funcionais polares e que apresentam afinidade com GNPs, além de uma cadeia apolar, que confere lipossolubilidade.
Fonte: Adaptado de Feltes[121].

Como exposto anteriormente, a obesidade é uma doença ligada a um quadro inflamatório, e desencadeia alterações como estresse oxidativo e disfunção mitocondrial, por isso sugere-se como forma de tratamento o uso de mecanismos que reduzam a inflamação. A busca de novos tratamentos se faz importante visto a ineficácia dos existentes e abrangência desta doença, para tal investigou-se a ação de GNPs na obesidade, devido apresentar bons resultados no estudo de outras doenças com quadros inflamatórios.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do tratamento com GNPs na adiposidade, resposta inflamatória e parâmetros bioquímicos em camundongos submetidos a obesidade.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS PARTE I

- Sintetizar e caracterizar GNPs esféricas de diâmetro médio de 18 nm;
- Associar ou não GNPs a lecitina de soja;
- Quantificar a concentração das GNPs isoladas ou associadas a lecitina de soja no tecido adiposo, cérebro, fígado e rim após administração;
- Avaliar toxicidade hepática e renal das GNPs isoladas ou associadas a lecitina de soja através de dosagens de ALT e Creatinina, respectivamente.

2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS PARTE II

- Administrar GNPs de 18nm, durante 14 dias, em camundongos submetidos ao modelo animal de obesidade induzido por dieta hiperlipídica;
- Avaliar o consumo alimentar, peso corporal e o peso da gordura mesentérica de camundongos submetidos a obesidade e tratados com GNPs;
- Analisar os níveis de glicose, triglicerídeos, colesterol total, lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e lipoproteínas de alta densidade (HDL) em camundongos submetidos a obesidade e tratados com GNPs;
- Verificar os níveis de TNF-α, IL-1β e IL-10 na gordura mesentérica e cérebro de camundongos submetidos a obesidade e tratados com GNPs;
- Identificar os níveis de EROs através da dosagem dos níveis de 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) e carbonilação de proteínas na gordura mesentérica e cérebro de camundongos submetidos a obesidade e tratados com GNPs;
- Quantificar a atividade da SOD e os níveis de GSH na gordura mesentérica e cérebro de camundongos submetidos a obesidade e tratados com GNPs;

- Avaliar a atividade dos complexos I e II da cadeia respiratória mitocondrial no cérebro de camundongos submetidos a obesidade e tratados com GNPs.

3. ETAPAS METODOLÓGICAS

3.1 TIPO DE ESTUDO

O presente estudo trata-se de um estudo experimental com modelo animal de obesidade.

3.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados camundongos 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). Os camundongos tiveram livre acesso à água e ração e foram mantidos em ciclos de claro/escuro de 12 horas cada e temperatura de 23±1°C, no biotério da UNISUL.

3.3 ASPECTOS ÉTICOS

O presente trabalho foi submetido à avaliação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) (anexo A) da Universidade do Sul de Santa Catarina (UNISUL), e aprovado sob o protocolo 16.018.4.01.IV. A utilização dos animais seguiu os Princípios de Cuidados de Animais de Laboratório do Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos da América, NIH, publicação número 80-23, revisada em 1996)[126], assim como a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos, publicada em 2013 pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA)[127].

3.4 LOCAL DE REALIZAÇÃO

O procedimento experimental foi realizado no Laboratório de Desenvolvimento em Tecnologia Farmacêutica - Tecfarma (UNISUL – Tubarão), Biotério (UNISUL – Tubarão) e Laboratório de Neurobiologia de Processos Inflamatórios e Metabólicos – NeuroIMet (UNISUL - Tubarão).

3.5 SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO

GNPs de tamanhos médios de 18 nm foram sintetizadas como descrito por Turkevich e colaboradores (1951)[128] com pequenas modificações[129], a partir de redução química do precursor metálico ácido tetracloroáurico ($HAuCl_4$). Citrato de sódio ($Na_3C_6H_5O_7.2H_2O$) foi empregado como agente redutor e estabilizante. O controle dimensional das nanopartículas foi efetuado utilizando-se uma concentração adequada do agente redutor, a saber, 8,5 mM.

Inicialmente, 100 mL de solução 0,50 mM de ácido tetracloroáurico, foi aquecida em balão de fundo redondo até 90 ºC sob agitação à 700 rpm. Uma solução de citrato de sódio, previamente preparada, foi então adicionada, e o sistema mantido sob refluxo e agitação a 200 rpm durante 20 minutos. O meio reacional foi resfriado naturalmente até temperatura ambiente e pH da solução ajustado a pH fisiológico com solução tampão. A seguir, a solução foi centrifugada (13.000 rpm por 15 min) e o sobrenadante removido. As GNPs foram lavadas duas vezes com água ultrapura e, finalmente, redispersa em salina para uso.

3.6 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO

Após a síntese, a solução de GNPs foi caracterizada empregando-se a técnica de espectroscopia de ultravioleta-visível (UV-Visível), via monitoramento da banda de superfície de plasmon ressonante (SPR). Para a espectrometria de UV-visível, a medida da banda de SRP, foi realizada à temperatura ambiente em um espectrofotômetro utilizando uma cubeta de quartzo contendo uma alíquota de 1 mL da solução, sendo que o espectro eletrônico da solução foi monitorado diariamente ao longo de uma semana no intuito de revelar qualquer alteração do comprimento de onda na máxima absorção.

Para medidas de difratometria de raios-x (DRX), uma alíquota de 9 mL da solução de GNPs foi centrifugada a 10.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante removido e o material sedimentado transferido para uma porta amostra e seco em estufa. As análises foram efetuadas num difratômetro de raios-X (Shimadzu LAB-X, modelo XDR – 6000) empregando-se os seguintes parâmetros: Comprimento de onda da radiação do tubo de cobre: 1.54056Å, voltagem de 30 kV; corrente de 30 mA: velocidade de varredura: 2°/min, ao passo de 0.02°, entre 20-80°

O diâmetro médio das GNPs foi calculado usando a equação de Scherrer (equação 1)[130].

$$D = \frac{K\lambda}{\beta\cos(\Theta)} \qquad \text{equação 1}$$

Onde, D é Diâmetro médio, K = 0,94, uma constante característica de partículas esféricas, λ é comprimento onda da radiação usada): 1,54056, β: Largura da banda a meia altura (total na metade máxima do pico em radianos) e θ: Ângulo de Bragg (do pico de 100% de intensidade)[120].

A caracterização morfológica das nanopartículas empregadas neste estudo foi efetuada com auxílio de um microscópio de transmissão eletrônica JEOL Titan 80-300 kV. As amostras foram preparadas da seguinte forma: imediatamente após a síntese, uma alíquota de solução de GNPs foi diluída até absorbância inferior a 0,10 e transferida para um micro tubo que foi mantido em banho ultrassônico por 15 minutos. Em seguida, uma porta amostra de cobre foi imerso na solução e deixado secar ao ar por 12 horas. A curva de distribuição de partículas foi efetuada selecionando-se uma região do porta-amostras contendo GNPs bem dispersas.

O potencial Zeta das soluções de GNPs foi medido num Zeta Potential Analyser, Zeta PALS Brookhaven Instruments, Holtsville, NY. A temperatura foi mantida a 25°C. A concentração de ouro nas soluções de GNPs foi determinada por espectrometria de absorção atômica (EAA) utilizando um Espectrômetro de Absorção Atômica da Varian modelo AA 240Z.

3.7 ASSOCIAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO COM LECITINA DE SOJA

A associação das GNPs com lecitina de soja foi efetuada conforme descrito anteriormente por Paula e colaboradores[131]. Resumidamente, uma solução de GNPs recém preparada foi centrifugada (13.000 rpm por 15 min) e o sobrenadante removido. As GNPs foram lavadas com água ultrapura e o procedimento repetido mais duas vezes. Ao final, as nanopartículas foram redispersas em solução salina contendo quantidade suficiente de lecitina de soja. A escolha das dosagens utlizadas foram adaptadas através de estudos prévios, e foi utilizado 70µg/kg/dia de nanopartÍculas

de ouro conforme estudo de Cardoso e colaboradores[132], e 2g/kg/dia de lectina de soja conforme estudo de Calderon e colaboradores[133].

3.8 DESENHO EXPERIMENTAL

A primeira parte deste estudo experimental avaliou, em camundongos de 40 dias, o efeito da administração de GNPs esféricas de tamanho médio de 18nm na concentração de 70μg/L (70μg/kg), associadas ou não a lecitina de soja, sobre a quantificação de GNPs no tecido adiposo, cérebro, fígado e rim, bem como avaliou os níveis de ALT e creatinina no soro, após períodos de 24horas e 14 dias de administração, 1 administração ao dia. Todos os animais tiveram livre acesso à água e ração (padrão) durante o experimento. Inicialmente os animais foram pesados e pareados em quatro grupos de igual número (n=10), conforme figura 09.

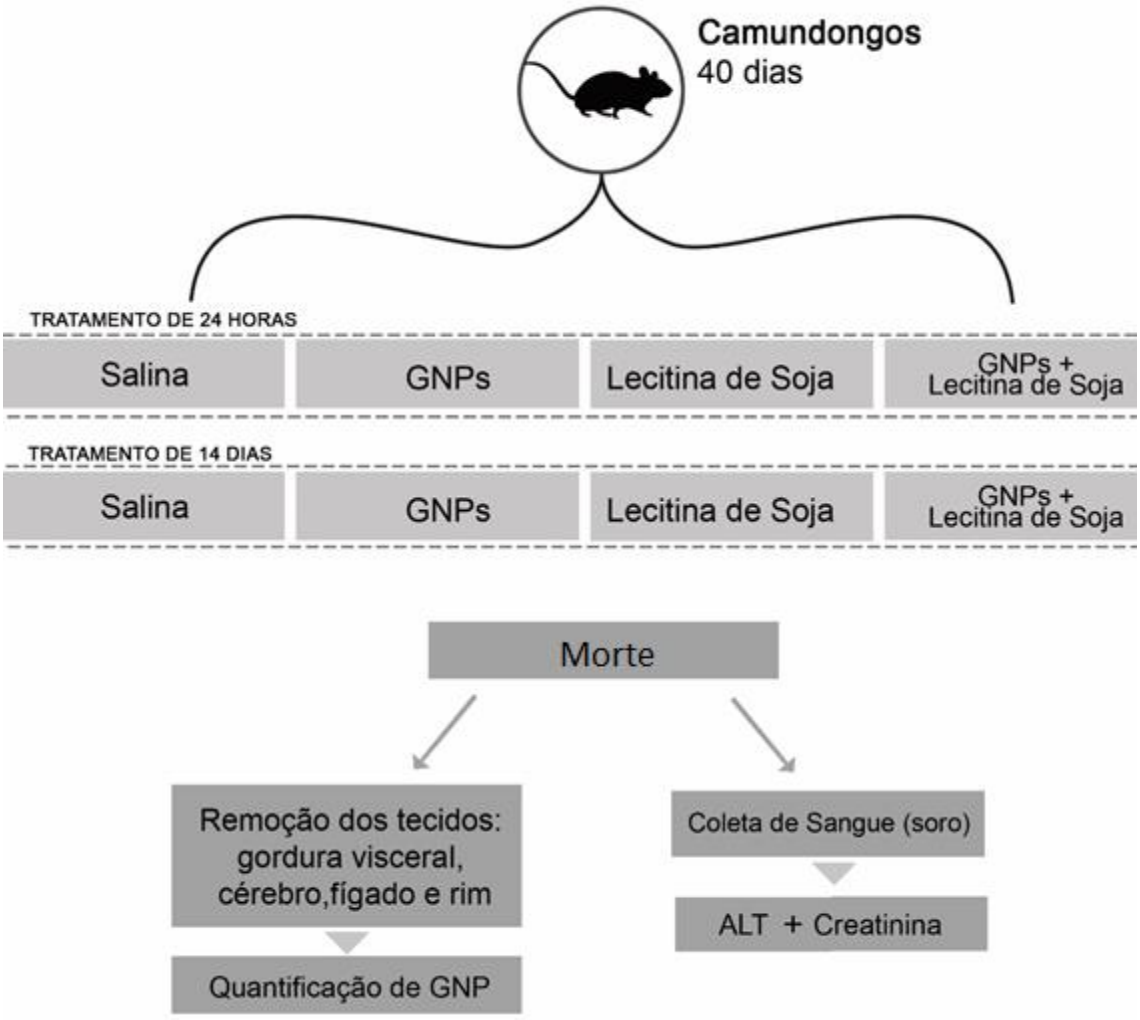

Figura 09- Desenho do estudo, parte I.

Ao final do experimento os camundongos foram anestesiados com quetamina (80mg/kg) e xilazina (10mg/kg) por injecção intraperitoneal, e após coletado sangue por punção cardíaca, assim os animais tiveram morte indolor assistida. O procedimento de Morte Indolor Assistida/Sacrifício foi realizado seguindo as disposições da Resolução nº 1000, de 11/05/2012[134], do Conselho Federal de Medicina Veterinária e da Lei Federal 11.794, de 08/10/2008[135]. Além do sangue, foram retirados para análise a gordura visceral, cérebro, fígado e rim.

A parte II deste estudo experimental induziu um quadro de obesidade em camundongos com 40 dias de idade – a partir do consumo de dieta hiperlipídica por

10 semanas – e avaliou o efeito da administração (14dias, uma vez ao dia) de GNPs esféricas de tamanho médio de 18nm. Baseado na parte I deste trabalho pode-se observar que a administração isolada de GNPs durante 14 dias confere concentração deste nanomaterial no tecido adiposo favorável para busca de um efeito anti-inflamatório, o que não foi observado quando associado GNPs a lecitina de soja. No que diz respeito ao tempo para a indução da obesidade em camundongos por dieta hiperlipídica, existe muita variabilidade nos trabalhos publicados, sendo que, na maior parte deles, o tempo varia de 8 a 12 semanas[24,136,137]. Em nosso grupo de pesquisa, a indução do modelo animal de obesidade foi padronizada em 10 semanas.

O protocolo para indução da obesidade e a composição das dietas foram baseados em estudos prévios[24,55]. Todos os animais tiveram livre acesso à água e ração (normolipídica ou hiperlipídica) durante o experimento. Inicialmente os animais foram pesados e pareados em 2 grupos de igual número:

- Dieta normolipídica (grupo controle) (n=60);
- Dieta hiperlipídica (grupo obeso) (n=60).

Os camundongos foram mantidos neste regime por 10 semanas. As rações foram adquiridas de empresa especializada em desenvolvimento e produção de dietas padronizadas para experimentação animal (PragSoluções Biociências – PragSoluções Comércio e Serviços Ltda – ME). Os dois tipos de ração (normolipídica e hiperlipídica) foram adquiridos da mesma empresa, visto que os ingredientes e a quantidade de micronutrientes podem variar de uma marca de ração para outra e isso poderia interferir nos resultados do estudo. Além disso, a ração do grupo normolipídico tinha os mesmos ingredientes da ração hiperlipídica, com exceção da banha de porco, fonte de gordura saturada utilizada para induzir obesidade. Assim, a dieta hiperlipídica forneceu mais calorias e maior percentual de gordura saturada que a dieta padrão. O percentual de gordura saturada em torno de 60% na dieta hiperlipídica é preconizado para a indução da obesidade em camundongos[138]. A comparação da composição, o valor calórico e o percentual de macronutrientes das dietas que foram utilizadas estão descritas nos quadros 01 e 02 abaixo. As informações foram baseadas em laudo fornecido pelo fabricante da ração e em estudos prévios conduzidos por Pauli e colaboradores[24] e Razolli e colaboradores[139].

Quadro 01 – Composição e valor calórico das dietas utilizadas.

COMPOSIÇÃO E VALOR CALÓRICO A CADA 1000g (1kg) DE RAÇÃO				
	Ração normolipídica		**Ração hiperlipídica**	
Ingredientes	**g/kg**	**kcal/kg**	**g/kg**	**kcal/kg**
Amido de milho	427,5	1710	115,5	462
Caseína	200	800	200	800
Sacarose	132	528	132	528
Amido dextrinizado	100	400	100	400
Óleo de soja	40	360	40	360
Banha de porco	-	-	312	2808
Celulose	50	-	50	-
Mix de minerais	35	-	35	-
Mix de vitaminas	10	-	10	-
L-Cistina	3	-	3	-
Bitartarato de colina	2,5	-	2,5	-
Butil hidroxitolueno (BHT)	0,028	-	0,028	-
Total	1000,028	3798	1000,028	5358

Fonte: Adaptado de PragSoluções Biociências, Pauli et al.[24] e Razolli et al[139].

Quadro 02 – Percentual de macronutrientes das dietas utilizadas.

PERCENTUAL DE MACRONUTRIENTES		
	Ração normolipídica	**Ração hiperlipídica**
Carboidratos	69 %	26 %
Proteínas	21 %	15 %
Lipídios	10 %	59 %

O consumo alimentar dos animais foi avaliado a cada 48 horas e foi calculado por meio da diferença entre a ração ofertada e as sobras. Além disso, o peso corporal foi mensurado semanalmente. A avaliação do consumo alimentar foi realizada durante a indução de obesidade em animais, pois pode-se acompanhar a aceitação da dieta, detectar alterações e influências ambientais, bem como acompanhar a relação com a evolução do peso corporal.

Após 8 semanas de indução de obesidade, os animais passaram a receber, além da dieta normolipídica ou hiperlipídica, administrações intraperitoneais de solução salina ou GNPs de 18 nm, uma vez ao dia, durante 14 dias, usando-se uma

seringa de insulina de 1 mL, até completar 10 semanas de experimento, de acordo com os grupos: Controle + Salina (n=30), Controle + GNPs (n=30), Obeso + Salina (n=30) e Obeso + GNPs (n=30). Durante este período o controle do consumo alimentar e peso corporal continuou sendo mensurado, confome demonstrado na figura 10.

Ao final do experimento uma parte dos camundongos (submetidos a análise de glicose e perfil lipídico) foram anestesiados com cetamina (80mg/kg) e xilazina (10mg/kg) por injecção intraperitoneal e após coletado sangue por punção cardíaca, assim os animais tiveram morte indolor assistida. Outra parte dos camundongos (a serem submetidos a análise inflamatória, de estresse oxidativo e disfunção mitocondrial) tiveram morte por decapitação, sendo que este método físico para a eutanásia se justifica pelo fato de que os métodos químicos interferem nas análises bioquímicas que foram realizadas e podem, portanto, invalidar o estudo[138]. O procedimento de Morte Indolor Assistida/Sacrifício foi realizado seguindo as disposições da Resolução nº 1000, de 11/05/2012[134], do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV) e da Lei Federal 11.794, de 08/10/2008[135] e foi realizado pelo Médico Veterinário responsável pelo biotério. Além do sangue, foram retirados para análise a gordura visceral, cérebro, fígado e rim.

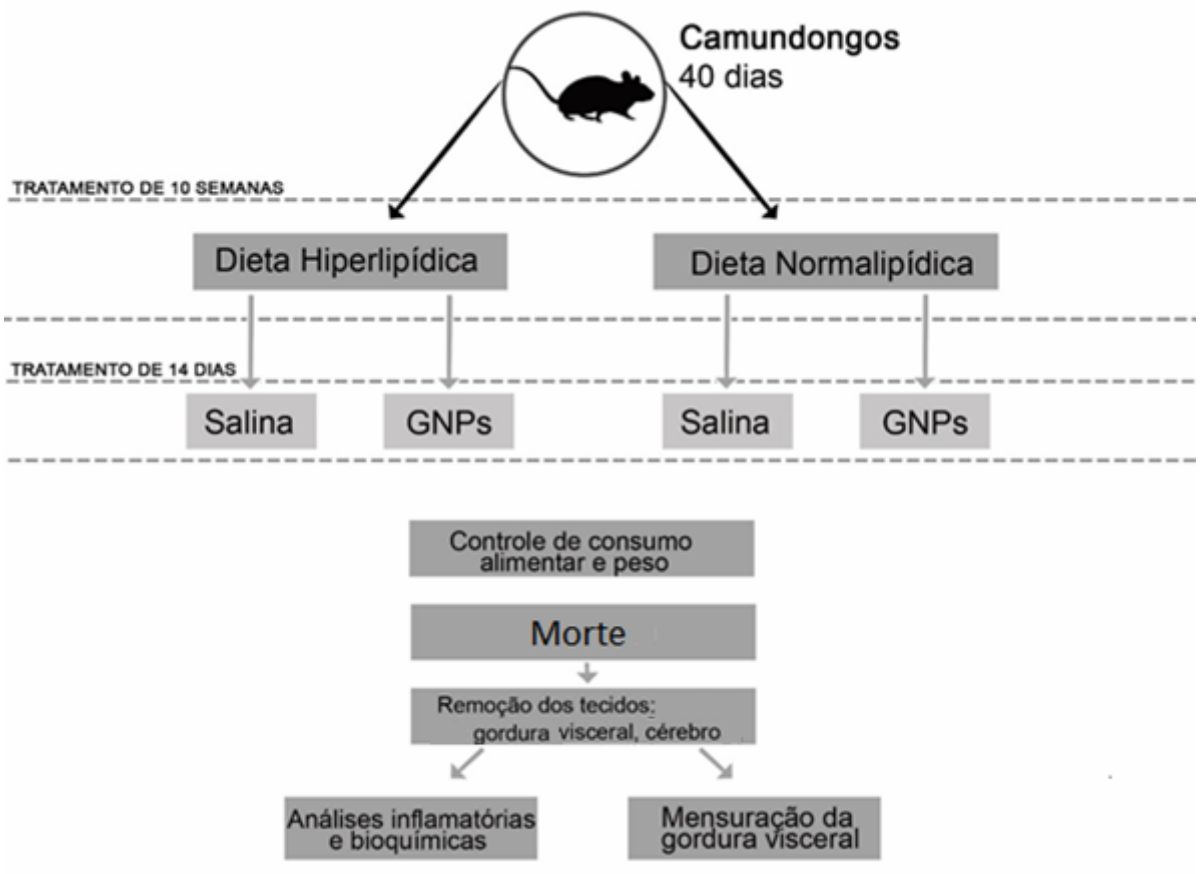

Figura 10 - Desenho do estudo, parte II.

3.9 COLETA DE SANGUE E REMOÇÃO DOS TECIDOS

O sangue foi coletado por punção cardíaca, onde os animais foram previamente anestesiados com cetamina (80mg/kg) e xilazina (10mg/kg) por injecção intraperitoneal. Em seguida, a cavidade abdominal foi aberta e o tecido adiposo da região visceral foi retirado conforme descrito por Johnson e Hirsch[140], lavado e pesado em balança de alta precisão. A gordura visceral foi mensurada somando-se o peso da gordura das regiões mesentérica, epididimal e retroperitoneal, conforme previamente descrito por Hansen et al[141]. O resultado da massa de gordura foi expresso em gramas. Além disso, o cérebro, fígado e rim também foram removidos. O cérebro, por sua vez, foi fracionado em hipotálamo, hipocampo, córtex pré-frontal e estriado. Todas as amostras foram congeladas e mantidas em freezer -80°C para posterior análise.

3.10 ANÁLISES LABORATORIAIS PARTE I

3.10.1 Quantificação da concentração das nanopartículas de ouro nos tecidos

Os tecidos (gordura mesentérica, cérebro, fígado e rim) foram pesados com máxima precisão e transferidos separadamente para copos de Becker (50 mL) previamente identificados. Em seguida, 10 ml de HNO3 (65%) foram adicionados e o sistema aquecido por cerca de 10 minutos numa placa de aquecimento. Após este tempo, foram adicionados 10mL de HCl (100%) e a solução mantida sob aquecimento por mais 15 minutos. Em seguida, adicionou-se água ultra-pura a cada solução e o sistema de aquecimento foi mantido constantemente com adição periódica de água ultrapura durante 30 minutos. Em seguida, foram adicionados mais 10 mL de HNO_3 e 10 mL de HCl e o meio reacional aquecido por 30 minutos.

Após a digestão completada e as soluções resfriadas foram transferidas separadamente para balões volumétricos de 25ml previamente identificados e completadas com água ultrapura. O teor de ouro foi determinado por espectroscopia de absorção atômica empregando um espectrômetro Varian modelo AA240 FS (Mulgrave, Austrália).

3.10.2 Avaliação de toxicidade

O sangue coletado dos animais foi centrifugado e o soro separado, onde a avaliação de dano hepático foi verificada a partir de dosagens de ALT e o dano renal através de creatinina. A avaliação da ALT foi determinada através do método cinético UV em espectrofotômetro semi-automático Bio-Plus 2000, utilizando kit comercial Labtest (ALT/GPT Liquiform Vet) e seguindo as recomendações e precauções sugeridas pelo fabricante. A avaliação da creatinina foi determinada através de método cinético em espectrofotômetro semi-automático Bio-Plus 2000, utilizando kit comercial LABTEST (Creatinina K Vet) e seguindo as recomendações de protocolo sugeridas pelo fabricante.

3.11 ANÁLISES LABORATORIAIS PARTE II

3.11.1 Avaliação dos níveis de glicose, triglicerídeos, colesterol total, HDL e LDL

Após coleta de sangue dos animais, este foi centrifugado e o soro separado. Os níveis no soro de glicose, colesterol total, triglicerídeos e HDL foram avaliados logo após coleta do material e conforme orientação do fabricante, no espectrofotômetro semi-automático (BioPlus 2000) através de kits comerciais específicos (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, MG, Brasil) seguindo a recomendação do fabricante.

-Kit de Glicose Liquiform Vet referencia: 1012-1/100 (Labtest)

-Kit Triglicerídeo- Liquiform 87-2/100 (Labtest)

-Kit de Colesterol Total Liquiform 76-2/100 (Labtest)

-Kit de HDL - 145-1/80 (Labtest)

Após obtenção destes valores, foi verificado os níveis de LDL através da fórmula de Friedwald, utilizando valor de colesterol total, HDL e Triglicerídeo[142].

3.11.2 Parâmetros de inflamação

A gordura mesentérica, hipotálamo, hipocampo, córtex pré-frontal e estriado foram homogeneizados, centrifugados e coletado sobrenadante para realização das análises inflamatórias. Os níveis de TNF–α, IL-1β e IL-10 foram determinados pela técnica de *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) em leitor de microplacas com a utilização de kits comerciais, seguindo as recomendações do fabricante. Os níveis de TNF–α, IL-1β e IL-10 foram normalizadas pelo conteúdo de proteínas, que foram determinadas conforme método de Lowry e colaboradores[143]. Os resultados foram expressos em picogramas por mililitro (pg/mL).

3.11.3 Parâmetros de dano oxidativo

Para avaliar a produção de ERO expressa na geração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) verificou-se as formação intracelular de 2',7'-diclorofluoresceína (DCF): a produção de hidroperóxidos nos tecidos foi determinada pela formação intracelular de DCF, da oxidação do diacetato de 2’,7’-diclorofluoresceína (H2DCF-DA) por ERO, de acordo com o método descrito anteriormente por Dong et al[144], com

algumas modificações. Os resultados foram expressos em U fluorescência/mg proteína.

O dano oxidativo em proteínas foi avaliado pela determinação de grupamentos carbonilas em proteínas oxidadas, com base na reação com dinitrofenilhidrazina, conforme método descrito por Levine e colaboradores[145]. Nesta técnica as proteínas foram precipitadas por adição de ácido tricloroacético a 20% e dissolvidas em dinitrofenilhidrazina. A absorbância foi avaliada em 370 nm e os resultados foram expressos em nmol de proteínas carboniladas por mg de proteína (nmol/mg proteína).

3.11.4 Atividade de enzimas antioxidantes

A atividade da enzima antioxidante SOD foi determinada pela inibição da auto-oxidação da adrenalina medida espectrofotometricamente, conforme descrito por Bannister e Calabrese[146]. 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 será 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. As proteínas foram determinadas pelo método de Lowry e colabores[143], e a albumina sérica bovina foi utilizada como padrão.

Os níveis de GSH foram determinados como descrito por Hissin e Hilf[195], com algumas adaptações. A GSH foi mensurada após precipitação de proteína com 1 mL proteína de ácido tricloroacético 10%. Na sequência foi adicionado tampão fosfato 800 mM, pH 7,4 e 500 µm de ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzóico) (DTNB). O desenvolvimento de cor resultante a partir da reação entre o DTNB e tióis atingiu um máximo em 5 min e manteve-se estável durante mais de 30 min. A absorbância foi lida a 412nm depois de 10 min. Uma curva padrão de glutationa reduzida foi usado para calcular os níveis de GSH nas amostras. Os resultados foram expressos em µmol/mg de proteína. As proteínas foram determinadas pelo método de Lowry et al[143], e a albumina sérica bovina foi utilizada como padrão.

3.11.5 Metabolismo energético

3.11.5.1 Atividade das enzimas da cadeia respiratória mitocondrial

A atividade do complexo I foi avaliada pelo método descrito por Cassina e Radi[147] pela taxa de NADH-dependente da redução do ferricianeto. Ao meio reacional foi adicionado tampão fosfato de potássio 100 mM, ferricianeto 10 mM, NADH 14 mM, rotenona 2 mM e amostra. Após a adição de todos os reagentes e da amostra, a leitura foi realizada espectrofometricamente à 420nm em intervalos de 1 em 1 min, durante 3 min. Os resultados foram expressos em U/mg de proteína. As proteínas foram determinadas pelo método de Lowry et al[143], e a albumina sérica bovina foi utilizada como padrão.

A atividade do complexo II foi mensurada pelo método descrito por Fischer e colaboradores[148] pela diminuição da absorbância do 2,6-dicloroindofenol (2,6-DCIP). A amostra foi adicionada a um meio de incubação contendo tampão fosfato de potássio 62,5 mM, succinato de sódio 250 mM e DCIP 0,5 mM. Foi realizada incubação por 20 minutos à 30ºC em banho-maria. Após a incubação adicionada azida sódica 100 mM, rotenona 2 mM e novamente DCIP 0,5 mM, para então realizar leitura espectrofotométrica em $\lambda = 600$ nm, a 1 min, por 5 min. Os resultados foram expressos em U/mg de proteína. As proteínas foram determinadas pelo método de Lowry e colaboradores[143], e a albumina sérica bovina foi utilizada como padrão.

3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa estatístico *GraphPad Prism* (versão 6). As análises entre dois grupos foram determinadas pelo teste t de Student e as diferenças entre mais grupos experimentais foram determinadas por análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo post hoc de Tukey. Os resultados foram apresentados em média ± erro padrão da média (EPM) e a significância estatística foi considerada para valores de $p<0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este estudo investigou potencial terapêutico e anti-inflamatório de GNPs no modelo animal de obesidade induzido por dieta hiperlipídica, visto que a mesma caracteriza-se por um estado inflamatório associado a alterações bioquímicas e metabólicas. Buscando desta forma evidenciar se o controle do quadro inflamatório na obesidade pode reverter alterações associadas.

Este experimento iniciou com síntese e caracterização de GNPs de 18nm, e associação desta a lecitina de soja, conforme mostra os espectros. Este espectro é típico de nanopartículas esféricas de ouro, com diâmetro médio de 18 nm[149]. Sabe-se que os metais nanoparticulados nobres exibem o fenômeno da ressonância plasmônica de superfície, que consiste na oscilação da nuvem de elétrons na superfície da nanopartícula metálica causada pela interação da luz com os elétrons nos orbitais d. Além disso, o tamanho da nanopartícula faz com que a banda de elétron ressonante mude para comprimentos de onda maiores. Este efeito pode ser usado para testar a estabilidade de nanopartículas em solução, como demonstrado por Sun e colaboradores.[150]

As soluções de GNPs foram sintetizadas e os espectros eletrônicos registrados diariamente, durante duas semanas. Neste intervalo, nenhuma mudança espectral foi observada, indicando a estabilidade das GNPs. Além disso, a substituição do citrato de sódio pela lecitina de soja não resultou em alterações substanciais no espectro UV-vis, sugerindo uma interação fraca entre os GNPs e os grupos funcionais da lecitina de soja. Isto pode ser visto por um desvio do pico máximo de absorção a cerca de 5 nm para a região vermelha após a adição de lecitina as GNPs, (Figura 11). Visto que o UV-vis inicia-se pelo processo de absorção quando a luz atravessa a amostra em que uma quantidade de luz é absorvida e esta absorção é a diferença entre a intensidade de radiação incidente e a radiação transmitida, expressa em transmitância ou absorbância[129].

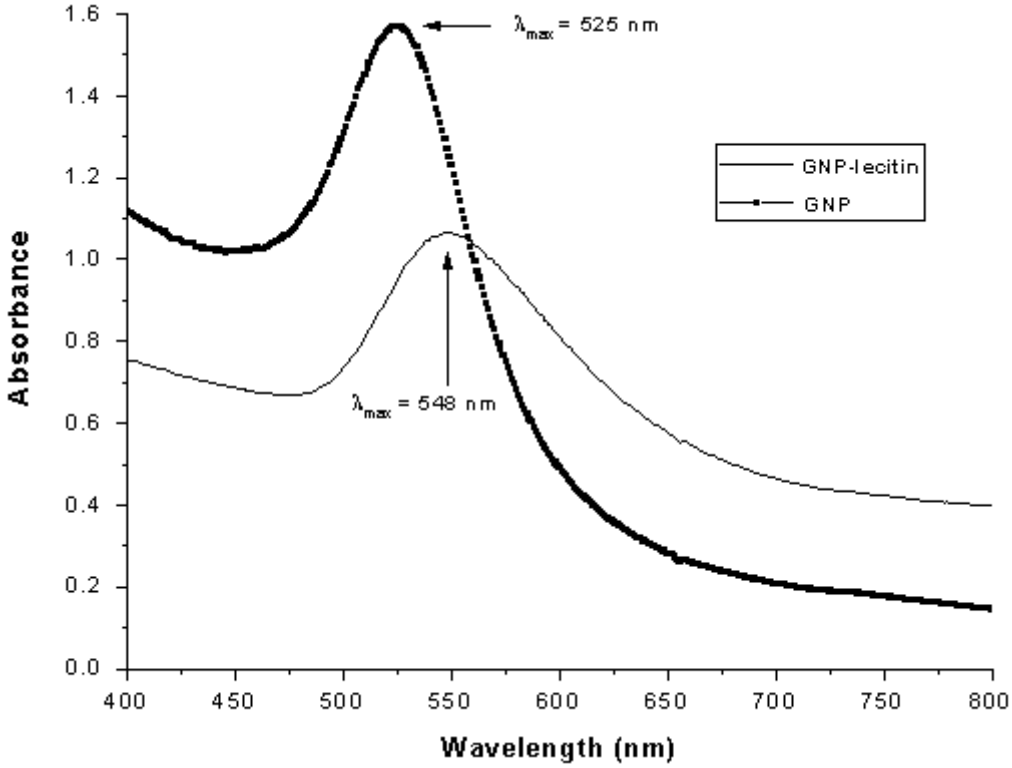

Figura 11 - Espectro eletrônico de uma solução de GNPs e GNPs associada a lecitina de soja.

No entanto, para os GNPs preparados por redução direta com lecitina de soja, o espectro eletrônico mostra uma banda SPR com máximo de 548 nm. É razoável supor que essa mudança é causada por uma forte interação entre os grupos de lecitina de soja e os elétrons da banda SPR. Anteriormente, o valor de pico de 540 nm era atribuído à absorção pela ressonância plasmônica de superfície das nanopartículas de ouro estabilizadas pelo fosfolipídio disperso (1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina DOPC). Foram observadas alterações na faixa de SPR de nanopartículas de ouro revestidas com lipídios. No entanto, neste caso, foram observados dois picos, com um máximo de 470 nm e 530 nm, respectivamente[151].

O espectro de difração de raios X mostra reflexos e planos cristalogricos correspondentes (entre parenteses) a 2Θ = 37,77 (111), 43,97 (200); 64,27 ° (220) e 77, 33° (311) como relatado anteriormente[151] e de acordo com os valores descritos no JCPDS Card Number: 4-0784. A difração de raios X desse padrão de nanopartículas de ouro mostra picos em 2Θ = 37,77º; 43,97º; 64,27º e 77,33º, que correspondem aos planos de cristal (1,1,1); (2,0,0); (2,2,0) e (3,1,1), respectivamente. Visto que a difração de raio x caracteriza as nanopartículas metálicas, nesse caso o ouro onde cada

elemento possui características próprias decorrentes de suas carcterísticas eletônicas e atômicas (parâmetro de rede, distancia interplanar, entre outros). E assim, apresentaram picos específicos em ângulos de difração[120].

Estes sinais estão de acordo com os valores descritos no número do cartão JCPDS: 4-0784. Aplicando a equação de Scherrer, obteve-se um valor de 18 nm para o diâmetro médio de cristalito destas nanopartículas. Isto está de acordo com o observado na análise do microscópio de transmissão de elétrons e medidas de DLS.

A Figura 12 corresponde a uma micrografia obtida por microscopia de transmissão de elétrons de GNPs associadas ou não a lecitina de soja. São observadas nanopartículas de geometria quase esférica e de tamanho médio de cerca de 18 nm. Isso está de acordo com o valor obtido para o tamanho de cristalito calculado a partir da equação de Scherrer, utilizando o pico de difração a $2\theta = 37{,}77^{o}$, bem como pelo valor médio encontrado pelas medidas de DLS (Figura 12).

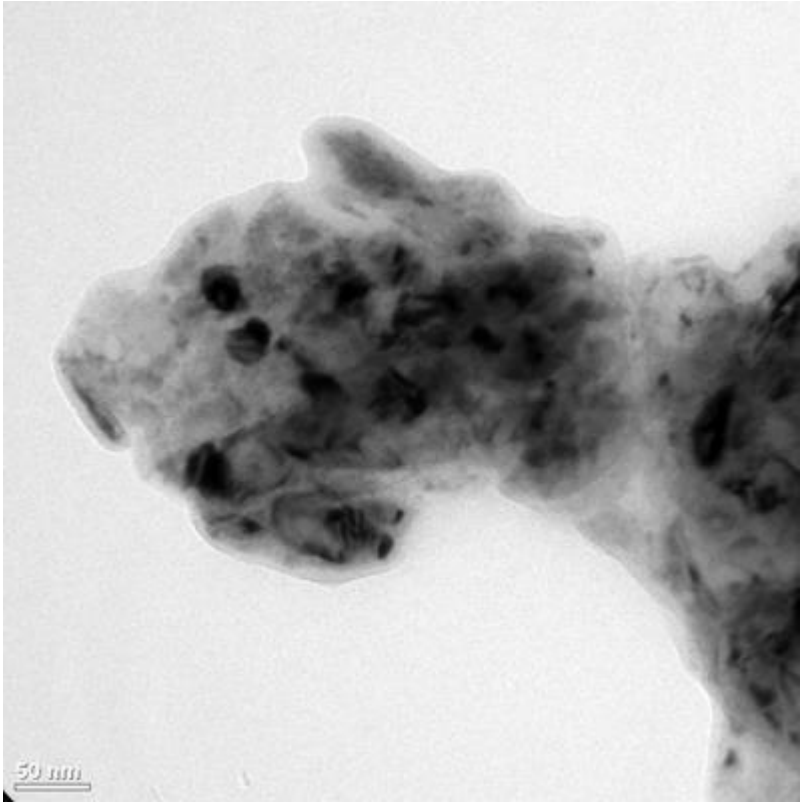

Figura 12 - Imagem representativa de uma análise de microscopia eletrônica de transmissão de GNPs modificados por lecitina de soja (300 kV).

A Figura 13 corresponde à curva de distribuição de tamanho das nanopartículas de ouro reduzidas e associadas ou não com lecitina de soja. Verifica-se que a curva

mostra um máximo a 22 nm. A partir do histograma, verifica-se que o método de síntese gera GNPs polidispersos, alguns dos quais atingem um diâmetro de até 90 nm. No entanto, a porcentagem de nanopartículas de maior diâmetro é baixa, de modo que, para a avaliação de estudos biológicos, será considerado um tamanho médio de 18 nm.

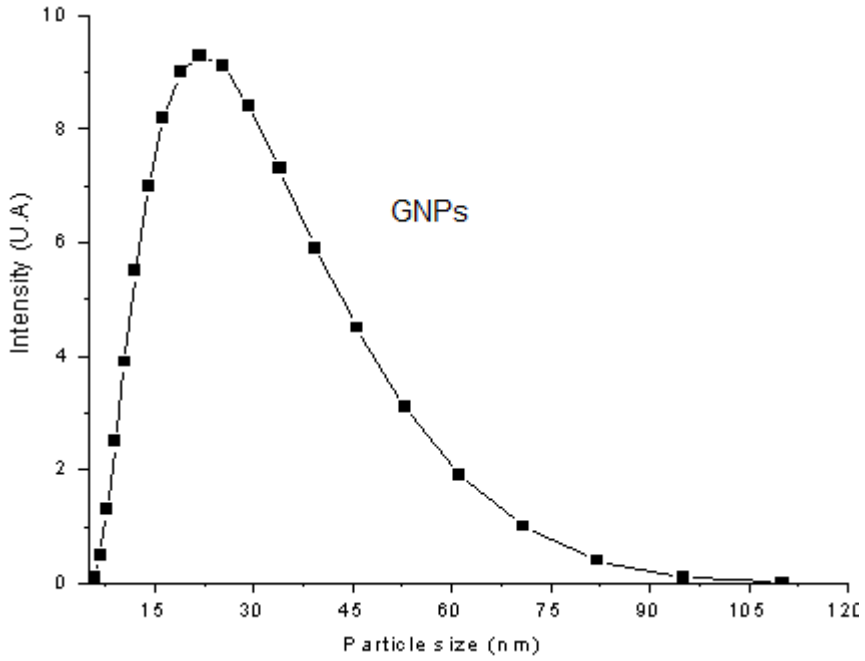

Figura 13 - Histograma mostrando a distribuição do tamanho de partícula de GNPs modificados pela lecitina de soja.

Após síntese e caracterização o presente estudo seguiu com experimento onde camundongos receberam uma vez ao dia a administração intraperitoneal de salina ou GNPs esféricas com tamanho médio de 18 nm na concentração de 70 µg/L (70µg/kg) associada ou não a lecitina de soja, por 24 horas ou 14 dias. Pode-se observar que após 14 dias a concentração de GNPs é maior no tecido adiposo em relação aos demais tecidos avaliados, fato que seria mais interessante em seu uso para o tratamento da obesidade, pois poderia atuar na inflamação presente nesse tecido (quadro 03).

Quadro 03 – Quantificação de GNPs e GNPs + Lecitina de soja nos tecidos.

Tempo de administração	Tecido avaliado	GNPs	GNPs + Lecitina de soja
24 horas	Gordura	<0,07	<0,07
	Cérebro	<0,07	<0,07
	Fígado	<0,07	60
	Rim	<0,07	<0,07
14 dias	Gordura	1746	113
	Cérebro	307	<0,20
	Fígado	486	237
	Rim	92	25.2

Absorção, distribuição, metabolismo, excreção e ação de um fármaco dependem do seu transporte através das membranas celulares. Os mecanismos pelos quais as drogas atravessam as membranas influenciam essa transferência são essenciais para entender o arranjo das drogas no corpo humano. As características de um fármaco que proporciona seu transporte e disponibilidade nos locais de ação são o peso molecular e a conformação estrutural, o grau de ionização, a lipossolubilidade relativa de seus compostos ionizados e não ionizados, que se ligam a proteínas séricas e teciduais[152]. Dessa forma, os resultados referentes às 24 horas após a administração das GNPs com lecitina de soja observou-se uma maior concentração no fígado, o que implica que no tempo de biotransformação deste complexo é maior, uma vez que eles precisam passar pelo fígado para depois serem biotransformados.

Em contraste, após 14 dias de administração de GNPs com lecitina de soja mostrou uma grande diferença de concentração nos tecidos. Levando-se em consideração que a administração apenas GNPs já mostrou uma alta concentração em gordura, cérebro, fígado e rim. A associação de GNPs com lectina de soja não levou a diferentes concentrações nos estudos teciduais, diferente do esperado, uma vez que a lecitina de soja é lipossolúvel e desta forma pode se acumular em maior quantidade no tecido adiposo.

Também se verificou que não houve efeito citotóxico sobre os parâmetros avaliados. Os resultados mostram que não houve alteração significativa nos níveis de ALT (Figura 14) e creatina (Figura 15) avaliados no soro comparando o grupo controle

com os grupos que receberam a administração de GNPs associadas ou não a lecitina de soja por 24 horas e 14 dias.

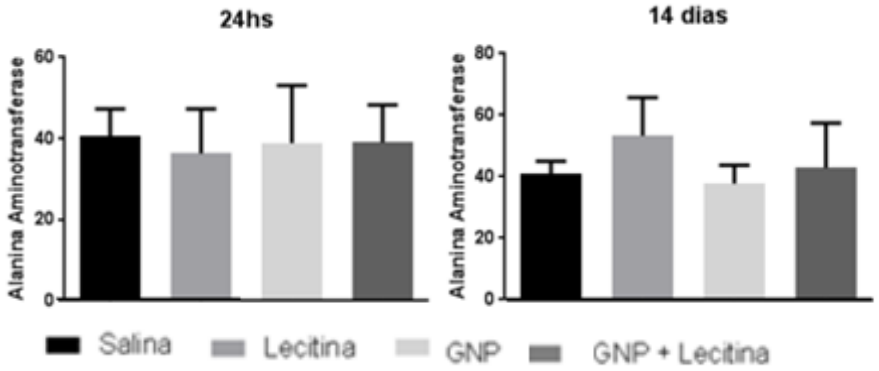

Figura 14 - Avaliação da ALT após administração de GNPs isoladas ou associadas a Lecitina de soja por 24 horas e 14 dias. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos salina e os GNPs. Valores expressos em média ± desvio padrão (n=10); p<0,05 (teste t de Student); *vs. Controle + Salina.

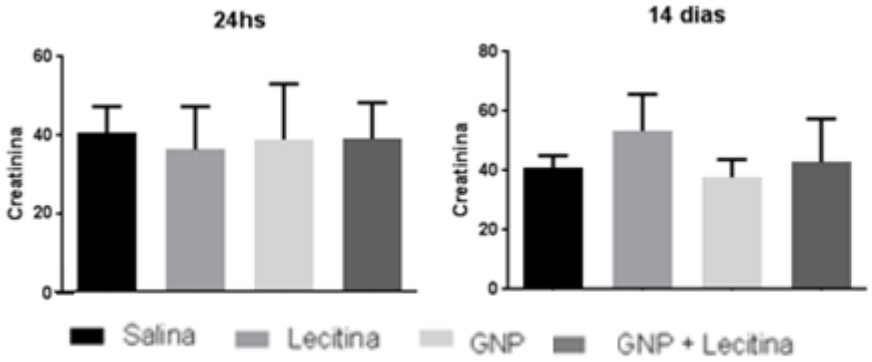

Figura 15 - Avaliação da creatinina após administração de GNPs isoladas ou associadas a Lecitina de soja por 24 horas e 14 dias. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos salina e os GNPs. Valores expressos em média ± desvio padrão (n=10); p<0,05 (teste t de Student); *vs. Controle + Salina.

Assim, não houve aumento estatisticamente significante da ALT e da creatinina em nenhum dos tempos de administração, sugerindo não haver dano hepático e renal nos grupos experimentais comparado ao grupo controle. Esse é um ponto importante, pois esses órgãos são responsáveis pelo metabolismo e excreção de fármacos e toxinas que controlam a homeostase corporal e, assim, indica segurança no uso de GNPs nessa concentração e durante 24 horas e 14 dias de administração.

Os achados do estudo corroboram com o estudo de Chen e colaboradores[156] que demonstrou que camundongos que receberam uma única dose (7,85 µg/g de peso) intraperitoneal de GNPs esféricos de 21 nm, sendo mortos após 1h, 24h e 72h da administração de nanopartículas, tiveram acúmulo destes nos rins e fígado, mas nenhum dano celular foi observado, com níveis semelhantes de ALT para os grupos controle e experimental. E Rambanapasi e colaboradores[152] avaliando a administração de GNPs de 14 nm por injeções intravenosa por 7 semanas também encontraram nanopartículas nos tecidos, principalmente fígado e baço, e não encontraram alteração hepática com ALT e bilirrubina, ou dosagem renal de creatinina e uréia, quando comparado animais que receberam o GNPs aos controles sem GNP.

Ainda estudo de Reeves e colaboradores[153], que avaliou o efeito de nanopartículas de ouro em diferentes doses (40, 200, 400 µg/kg/dia) no tamanho de 12,5 nm através de administrações intraperitoneais por 8 dias em camundongos, e encontrou acúmulo nos pulmões, rins, fígado, baço e cérebro. Indicando a sua absorção pelos tecidos, mas não foram observados danos fisiológicos nos tecidos, nem mortalidade ou alterações comportamentais nos animais.

Ao contrário desses estudos, Zhang e colaboradores[154] concluíram que a administração em camundongos de uma dose única de 4000 µg/kg intraperitonealmente de GNPs revestidos com PEG em tamanhos de 10 e 60 nm causou um aumento na AST (aspartato aminotransferase) e ALT, indicando dano hepática. No entanto, os GNPs nos tamanhos de 5 e 30 nm não causaram alteração dessas enzimas.

Considerando os resultados encontrados na primeira parte desse estudo, onde houve depósito de GNPs nos tecidos, principalmente adiposo, e sem dano hepático ou renal, foi proposto no segundo momento investigar o efeito das GNPs na obesidade sobre parâmetros inflamatórios e bioquímicos em cérebro e gordura visceral de camundongos. Assim, o presente estudo usou um modelo animal de obesidade induzido pelo consumo de uma dieta hiperlipídica. O consumo de lipídios de cadeia saturada está relacionado ao excesso de adiposidade[37,38], alteração nos marcadores inflamatórios e desregulação das enzimas metabólicas. Com base nesses fatos, as dietas hiperlipídicas são usadas para induzir a obesidade em roedores[21].

O consumo de ração foi mensurado a cada 48 horas. Conforme apresentado na figura 16, o consumo em gramas foi menor nos camundongos que receberam dieta hiperlipídica. Isso pode ser explicado devido o alto teor de gordura saturada aumentar

a saciedade[155] e assim reduzir a quantidade ingerida. Entretanto, quando apresentado consumo em calorias, verifica-se que os camundongos que receberam dieta hiperlipídica consumiram mais calorias que os controles.

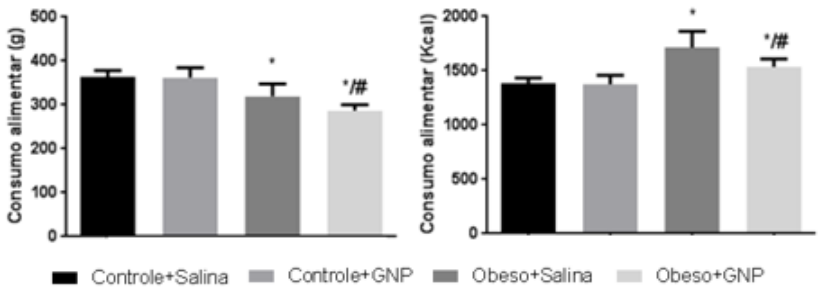

Figura 16 – Efeito da administração de GNPs no consumo alimentar de camundongos submetidos a obesidade. Valores expressos em média ± desvio padrão (n=30); * vs. Controle + Salina; # vs. Obeso + Salina; $p<0.05$ (ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey).

Quando comparado grupo obeso + salina ao grupo obeso + GNPs, o grupo que recebeu GNPs apresentou menor consumo em gramas e kcal, o que pode indicar efeito benéfico de GNPs sobre consumo alimentar. Estes dados de ingestão alimentar diferem do estudo de Chen e colaboradores[156], onde não houve mudança na ingestão alimentar dos animais avaliados que receberam GNPs. Neste sentido, pode-se sugerir que um tempo maior neste tratamento apresentaria também redução em peso corporal e gordura visceral, e que desta forma seria uma alternativa para controle da obesidade.

Conforme a figura 17 foi possível observar que após 8 semanas (início do tratamento) os camundongos que receberam dieta hiperlipídica ganharam mais peso estatisticamente que os camundongos do grupo controle (dieta normolipídica), permanecendo assim até o final do experimento com 10 semanas. No entanto, a administração de GNPs não reverteu o ganho de peso corporal destes animais. Estudo de Chen e colaboradores[156] também não encontrou alteração de peso corporal em ratos tratados com uma única administração via intraperitoneal de GNPs esféricas de tamanho médio de 21nm na dose de 7,85 µg/g de peso, após 1, 24 e 72 horas da administração. O pouco tempo de administração de GNPs pode ser fator limitante na perda de peso. Apesar do presente estudo ter administrado GNPs por 14 dias, também não foi possível verificar efeito das nanopartículas na perda de peso. Sugere-

se que estudos com períodos de administração mais longos possam desempenhar esse mecanismo através do papel anti-inflamatório das GNPs.

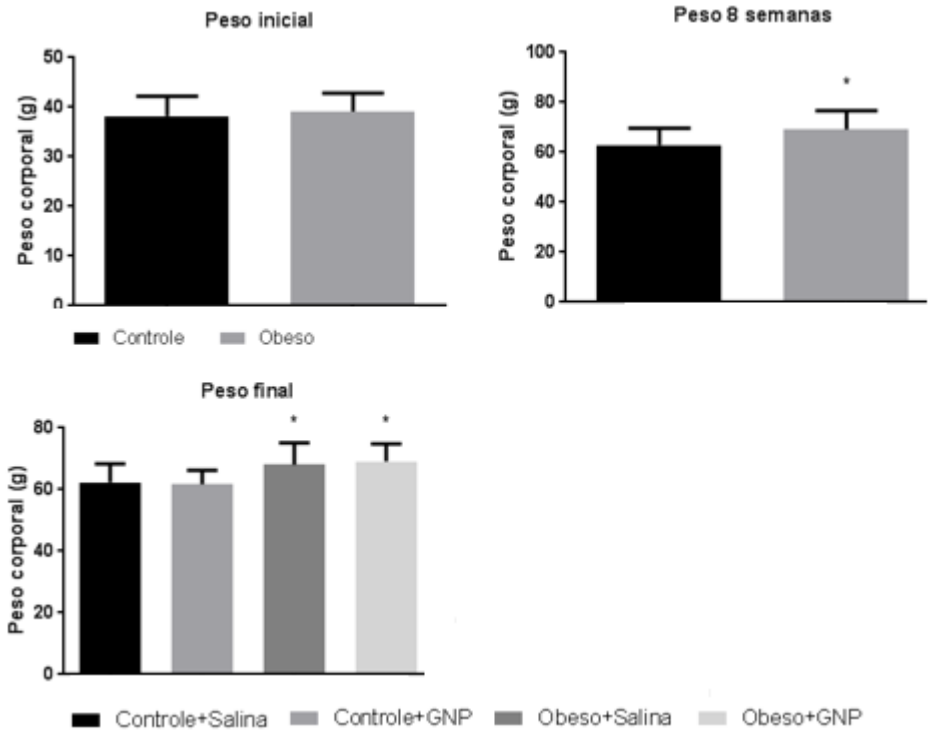

Figura 17 – Acompanhamento do peso corporal de camundongos submetidos à obesidade e tratados com GNPs. Valores expressos em média ± desvio padrão (n=30); * vs. Controle + Salina; $p<0,05$ (Teste t de Student para comparar dois grupos e ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey para comparar quatro grupos).

Ao final do experimento, a gordura visceral dos camundongos foi isolada e pesada. Conforme a figura 18, o peso da gordura visceral foi maior nos camundongos que receberam dieta hiperlipídica, bem como a administração de GNPs não reduziu o acúmulo dessa gordura. Foram isoladas gorduras mesentérica, epididimal e retroperitonial, e apenas a gordura mesentérica teve peso maior estatisticamente quando comparado grupo controle e obeso, sem diferença estatística entre o grupo obeso + salina e obeso + GNPs. Este aumento de tecido adiposo em virtude da dieta hiperlipídica esta relacionado como o desenvolvimento de parâmentros inflamatórios na obesidade, através de sinalização de citocinas pró-inflamatórias[61].

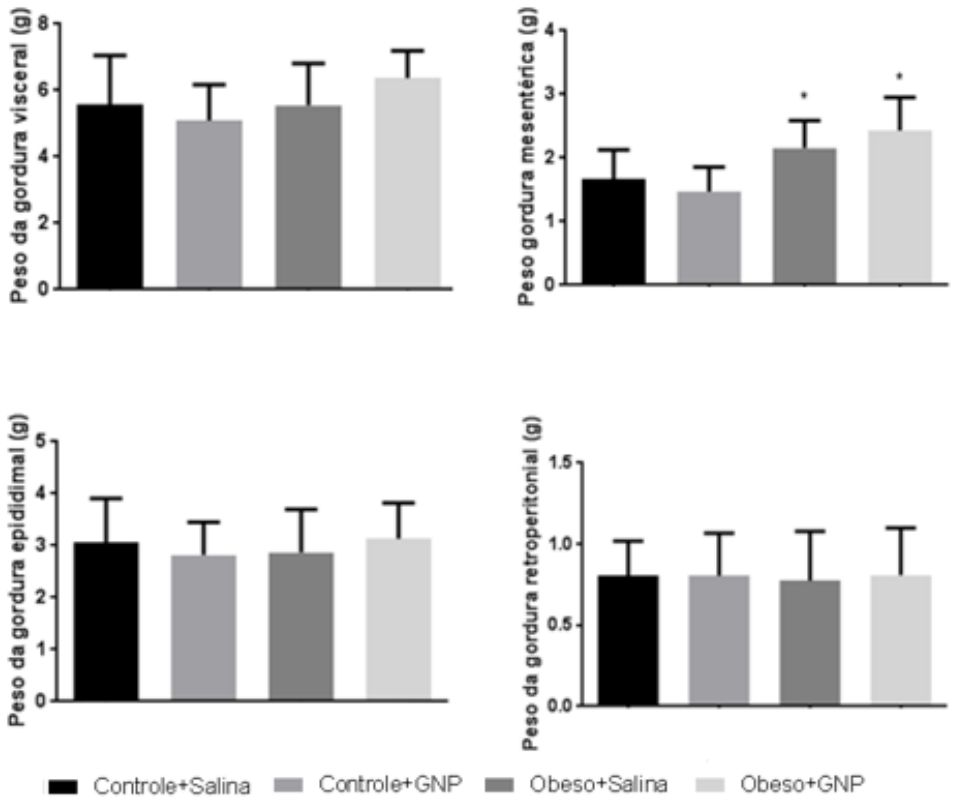

Figura 18 - Efeito da administração de GNPs no peso da gordura visceral, mesentérica, epididimal e retroperitonial de camundongos submetidos a obesidade. Valores expressos em média ± desvio padrão (n=30); * vs. Controle + Salina; # vs. Obeso + Salina; $p<0.05$ (ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey).

Além disso, foi avaliado os níveis de glicose, colesterol total, triglicerídeos, HDL e LDL e foi visto que não houve alterações significativas quando comparado os grupos, com exceção da glicose, onde o grupo obeso que recebeu salina apresentou menores níveis de glicose, comparando ao grupo controle. Assim, os animais que receberam dieta hiperlipídica apresentaram valores glicêmicos abaixo dos animais que receberam dieta normolipídica. A administração de GNPs reverteu esta redução nos níveis glicêmicos (figura 19).

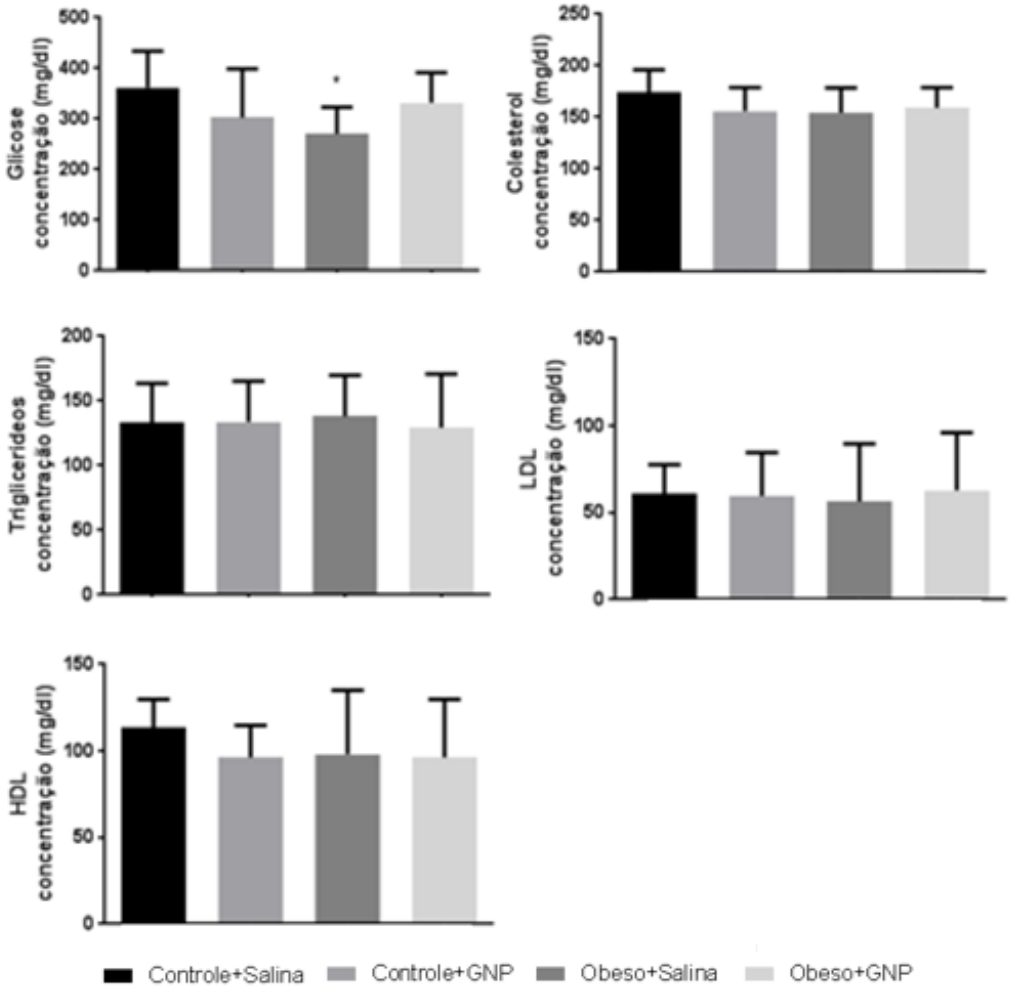

Figura 19 – Efeito da administração de GNPs nos níveis de glicose, colesterol total, triglicerídeos, LDL e HDL em camundongos submetidos a obesidade. Valores expressos em média ± desvio padrão (n=10); * vs. Controle + Salina; # vs. Obeso + Salina; $p<0.05$ (ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey).

Este achado refrente aos níveis de glicose pode elucidar os mecanismos de ação das GNPs e sua influência no metabolismo, nesse caso, atuando sobre a secreção de insulina. Storlien e colaboradores[157], evidenciaram que a ingestão de uma dieta rica em gordura contribui significativamente para o acúmulo de ácidos graxos e alterações na secreção de insulina. No animal obeso, a dieta hiperlipídica e o acúmulo de gordura refletem num processo inflamatório que, por conseguinte, atua no organismo estimulando a secreção e o predomínio de elevados níveis de insulina[158,159] o que pode ter refletido em nosso estudo, acarretando baixos níveis glicêmicos.

Nos animais obesos tratados com solução salina, o grau de inflamação

encontrado é mais alto e, consequentemente, a secreção de insulina também.

Basicamente o metabolismo atua, nesses casos, elevando a produção pancreática de insulina a fim de diminuir a glicemia decorrente da dieta hiperlipídica. Como já é conhecido que as GNPs diminuem marcadores inflamatórios[156], pode-se supor que com a diminuição do processo inflamatório, ocorreu a diminuição da secreção insulínica dos animais que receberam as GNPs, e assim a quantidade de insulina circulante foi mais baixa, fato que elevou os níveis glicêmicos encontrados no obeso + GNPs, que foi semelhante ao grupo controle.

Quanto aos valores de colesterol e triglicerídeos, neste estudo não foi observado alterações de suas concentrações no grupo obeso, nem após a administração de GNPs. Muller e colaboradores[159], também não observaram alterações nesses mesmos parâmetros, após a administração intraperitoneal de GNPs em tamanhos de 20 nm durante 21 dias em ratos Wistar machos com peso normal.

A falta de variação nos valores séricos de triglicerídeos vai ao encontro da variação de peso observado neste estudo. Uma vez que na obesidade, o excesso de substrato, adquirido através de uma alta ingestão energética, é armazenado na forma de triglicerídeos em células denominadas adipócitos[160], que formam o tecido adiposo[161]. O tecido adiposo responde ao consumo em excesso de nutrientes pela hipertrofia e hiperplasia dos adipócitos. Supostamente, a não alteração dos valores de triglicerídeos, corrobora que o excesso de calorias ingerida foi armazenado na forma de tecido adiposo, contribuindo para a elevação do peso da gordura e do peso corporal do animal.

Até o momento, não foram localizados estudos que avaliassem o efeito das GNPs sobre os níveis de LDL e HDL em camundongos obesos. Em nosso estudo, não foram observadas diferenças significativas entre o grupo controle e o grupo obeso, e ainda, as GNPs mostraram não influenciar na concentração sérica dessas substâncias. Portanto esse é o primeiro estudo a relatar que as GNPs não interferem nos níveis séricos de LDL e HDL.

Cliffton e colaboradores[162], sugerem que o tipo de dieta utilizado pouco influência nos níveis de colesterol sérico; sendo eles determinados quase que exclusivamente pela atividade metabólica, reflexo da carga genética do indivíduo e de sua idade e sexo. Fato que corrobora os achados presente estudo, uma vez que os camundongos alimentados com dieta normolipídica mantiveram níveis séricos de LDL

e HDL semelhantes aos encontrados nos animais alimentados com dieta hiperlipídica.

As análises de TNF-α, IL-β e IL-10 (figura 20), confirmam quadro inflamatório presente no modelo animal de obesidade utilizado neste trabalho. Além disso, diferentes estudos já haviam relatado quadro inflamatório nesta doença[21,59,62,63].

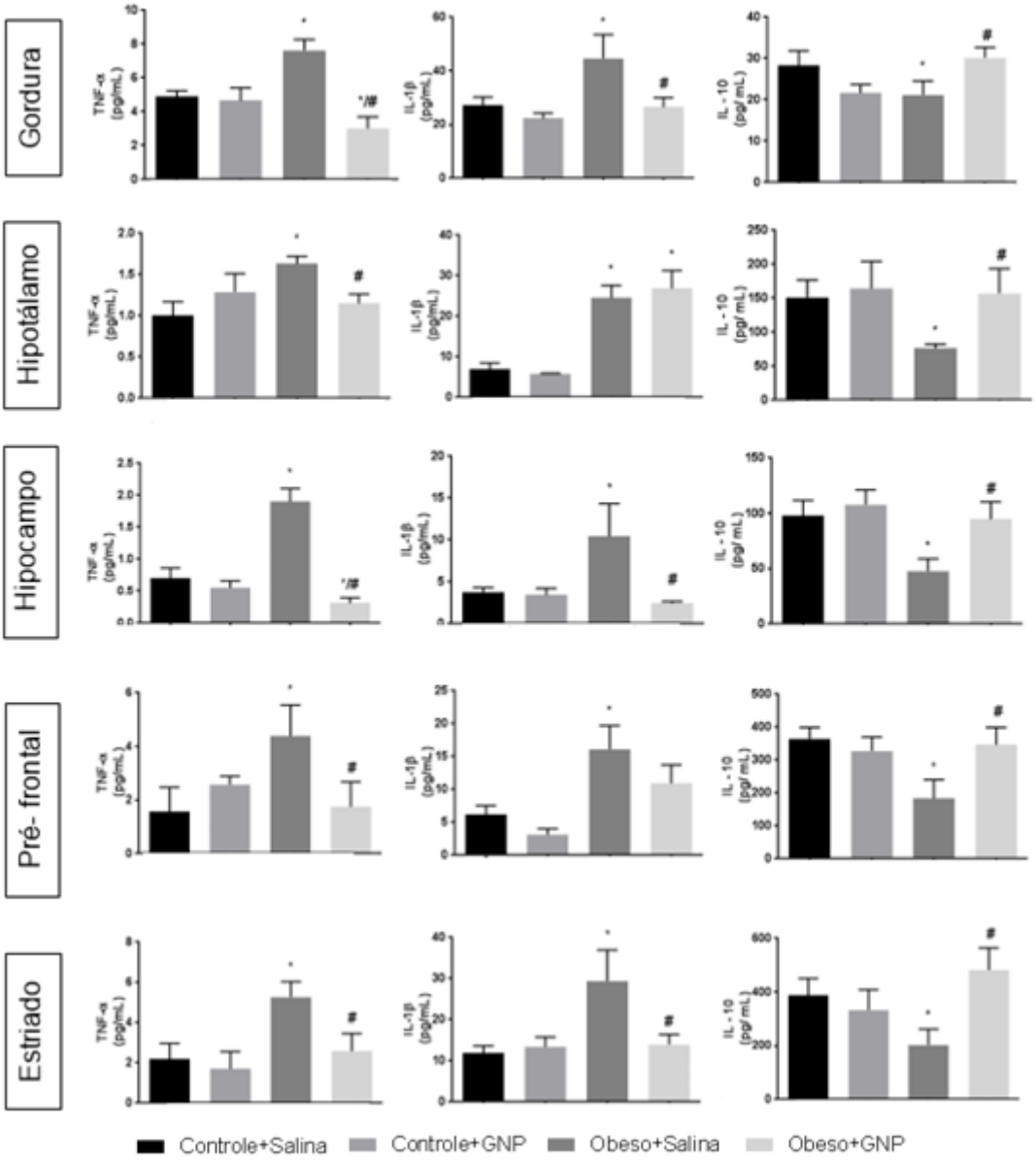

Figura 20 - Efeito da administração de GNPs sobre parâmetros inflamatórios na gordura mesentérica e estruturas cerebrais de camundongos submetidos a obesidade. Valores expressos em média ± desvio padrão (n=10); * vs. Controle + Salina; # vs. Obeso + Salina; $p<0.05$ (ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey).

Os animais do grupo obeso apresentaram maior expressão de TNF-α e IL-1β

na gordura mesentérica e estruturas cerebrais, e o grupo obeso tratado com GNPs apresentou reversão deste quadro na maioria das estruturas avaliadas, exceto para IL-1β no hipotálamo. A IL-1β é uma citocina envolvida no processo inflamatório que medeia a regulação positiva de muitas citocinas inflamatórias, como o TNF-α que é responsável pela sinalização inflamatória através do receptor da IL-1β, seguida da ativação do fator nuclear-kappa B (NF-kb)[163]. Diversos estudos corroboram essa informação, uma vez que demonstraram que animais alimentados com dieta hiperlipídica apresentaram aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-1β e TNF-α[21,59,164]. Vale ressaltar que os estudos publicados até o momento apresentam uma série de peculiaridades relacionadas aos métodos utilizados. No entanto, apesar das diferenças metodológicas, todos convergem para o mesmo ponto e levam à mesma conclusão: a inflamação contribui para a patogênese da obesidade[165,166].

Rocha[167] ilustra, esquematicamente, os mecanismos de ação das GNPs sobre a via inflamatória e oxidativa propostos na literatura (figura 1), sendo: (1) a regulação negativa da citocina pró-inflamatória IL-1β, não permitindo sua ligação a receptor específico; (2) inibição das ERO e cascata do estresse oxidativo; (3) inibindo sinalização NF-kB via bloqueio da fosforilação IkB quinase com a não translocação de NF-kB para núcleo. Desta forma, acreditamos que as GNPs possuem ação anti-inflamatória.

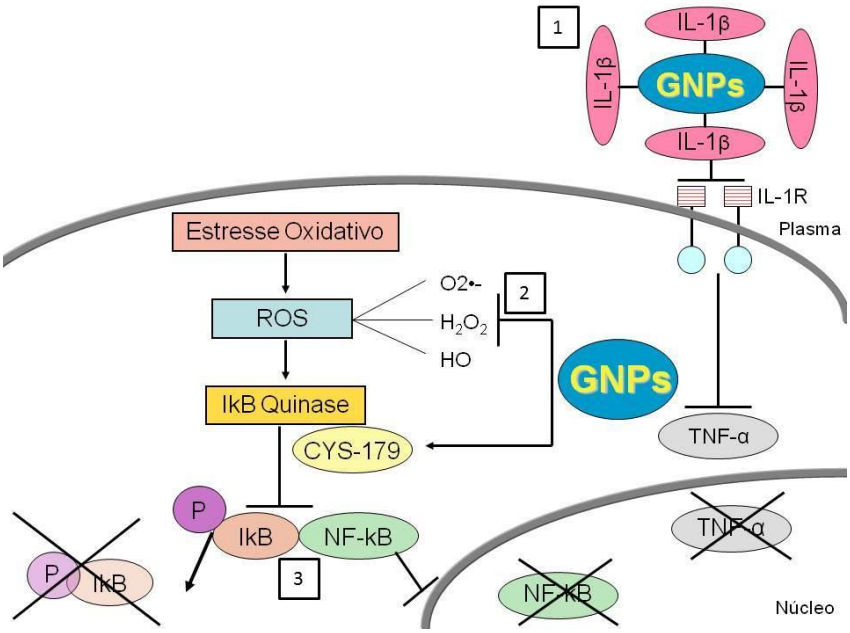

Figura 21 - Ilustração sobre os possíveis mecanismos de ação das GNPs.

Fonte: Adaptado de Rocha e colaboradores[167].

Como já demonstrado na literatura, uma dieta hiperlipídica compromete a integridade da BHE, facilitando assim a entrada de células imunes no SNC, bem como ácidos graxos saturados que podem causar inflamação no hipotálamo[5]. Nesse sentido, tanto a dieta hiperlipídica quanto as alterações periféricas do acúmulo de gordura corporal estão associadas à ativação microglial, e a expressão do gene da citocina ocorre predominantemente nesses tipos de células[166]. Em artigo de revisão[15], os autores apontaram que a ativação do NF-kB mediada pelo TNF-α, em células da glia, foi um elemento-chave para os efeitos deletérios dessa citocina. Todos esses mecanismos, incluindo a infiltração de leucócitos e ácidos graxos livres no SNC, bem como a ativação celular no SNC, contribuem para a produção de ERO, com consequente dano oxidativo[166].

Os resultados do presente estudo também mostram que os animais do grupo obeso apresentaram uma redução nos níveis de IL-10 na gordura, hipotálamo, hipocampo, córtex pré-frontal e estriado em comparação com os animais alimentados com uma dieta normolipídica. Os animais obesos quando tratados com GNPs obtiveram um aumento nos níveis de IL-10, fato importante devido esta ser uma interleucina anti-inflamatória.

Esse achado é consistente com o estudo de Wang[169], que também encontrou uma diminuição na expressão de IL-10 no hipotálamo de animais obesos (50% de ingestão de gordura saturada na dieta). Outro estudo, de Van e colaboradores[63] demonstrou um aumento significativo nos níveis de IL-10 no líquido cefalorraquidiano de indivíduos obesos após perda de peso devido à cirurgia bariátrica. Desta forma, visto que GNPs é composto por um metal nobre, acredita-se que o ouro possa estimular a liberação de IL-10 fazendo com que houvesse o aumento da mesma.

Os resultados apresentados na figura 22 indicam que os animais do grupo obeso apresentaram maior dano oxidativo, e quando comparado ao grupo que recebeu o tratamento com GNPs os resultados foram favoráveis. Neste sentido, pode-se observar aumento nos níveis DCF e carbonilação proteica na gordura mesentérica e cérebro de camundongos obesos, e quando tratados com GNPs houve uma reversão do quadro.

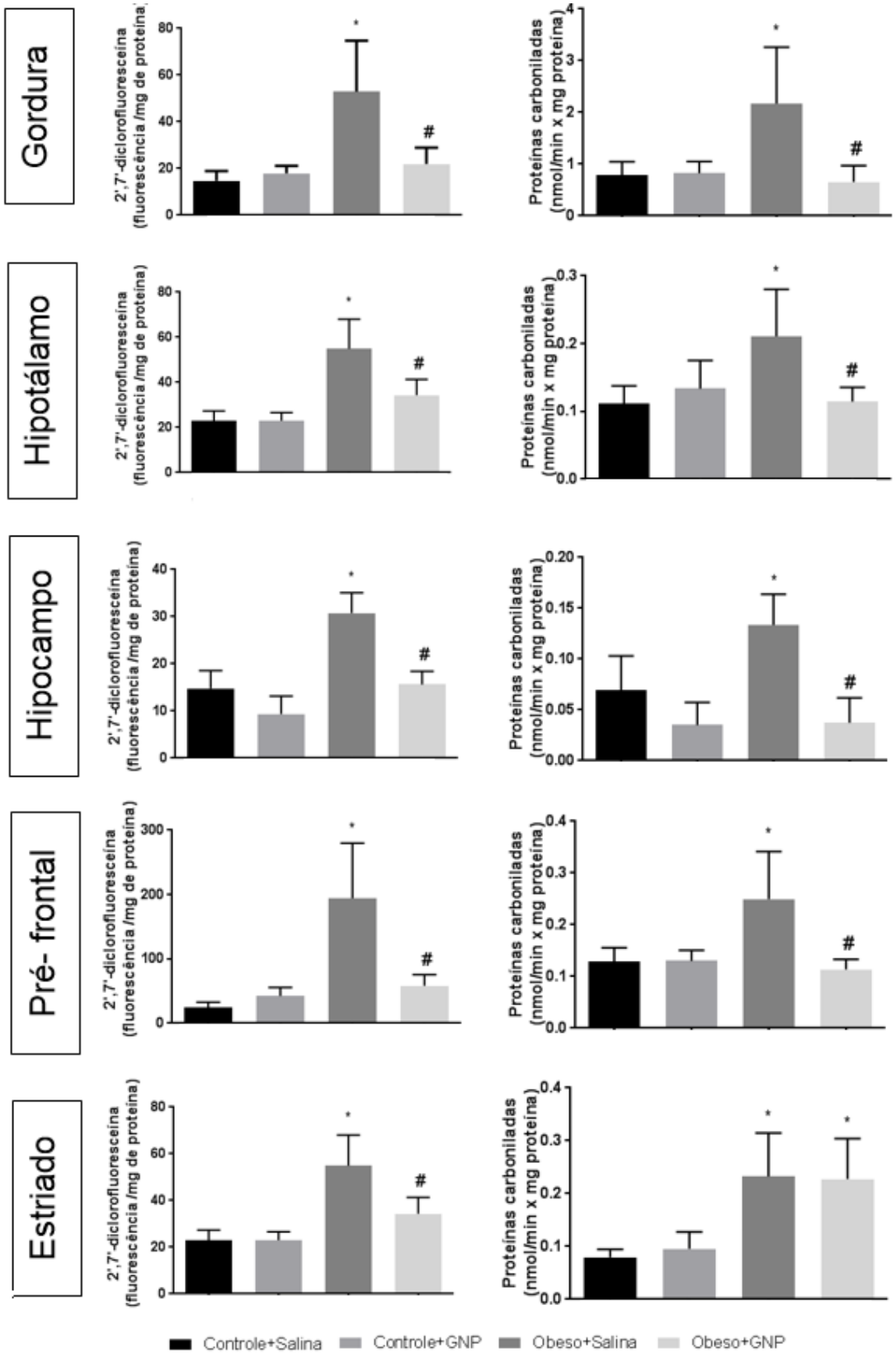

Figura 22- Efeito da administração de GNPs sobre dano oxidativo na gordura mesentérica e estruturas cerebrais de camundongos submetidos a obesidade. Valores expressos em média ± desvio padrão (n=10); * vs. Controle + Salina; # vs. Obeso + Salina; $p<0.05$ (ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey).

O estado inflamatório no qual se encontram os indivíduos obesos favorece o desequilíbrio do estado redox a favor das vias pró-oxidativas. É provável que a inflamação não só intensifique o estresse oxidativo, mas também os produtos citotóxicos gerados pela ação dos radicais livres contribuam para manter esse quadro inflamatório[170].

Neste sentido, o aumento de agentes oxidantes no cérebro é de grande preocupação, uma vez que a exposição crônica a ERO pode causar grandes danos às membranas celulares, levando à perda da integridade e viabilidade celular[171,172]. Em contraste com a grande produção de ERO, o SNC tem baixos níveis de enzimas antioxidantes em comparação com outros órgãos[173].

Estudos anteriores já demonstraram uma redução dos níveis de superóxido, DCF e nitrito em modelos animais de lesão muscular utilizando as GNPs como tratamento associada ou não a outras terapias[31,32]. Segundo os autores, foi possível observar uma redução dos níveis de ON e iNOS, provavelmente pelas GNPs estarem regulando a transcrição dos níveis de iNOS[91]. Alguns trabalhos citam as GNPs como agente antioxidante, inibindo a cascata de formação das ERO, e/ou melhorando o sistema de defesa antioxidante enzimático, mas o mecanismo exato ainda não está claro[174].

Lai et al (1977) demonstraram, em um estudo com células endoteliais, que GNPs aumentam níveis de NRF2, que induz a sinalização de genes antioxidantes. Este aumento é causado por ação das GNPs que afeta as ligações tiois de keap1, assim, mudando sua conformação e liberando NRF2 para posterior transcrição de genes citoprotetores, desta forma, contribuindo com efeito antioxidante. Em adição, o efeito anti-inflamatório das GNPs pode estar auxiliando a redução de radicais livres, já que macrófagos e neutrófilos ativados produzem ERO, ERN e ácido hipocloroso com a finalidade de degradação e limpeza celular[175].

Diferentes estudos indicam presença de estresse oxidativo no SNC de camundongos obesos[91,176,177] e para reverter esta situação seria necessário a ação de defesas antioxidantes como SOD e GSH. Assim, foi possível observar neste estudo conforme figura 23, que a atividade da SOD se mostrou maior no grupo obeso e reduzida na maioria das estruturas avaliadas nos animais obesos que receberam GNPs, exceto no hipocampo onde não apresentou diferença estatística. Já os níveis de GSH estavam reduzidos no grupo obeso que recebeu salina quando comparados ao grupo controle, bem como foi maior significativamente quando comparado obesos

tratados com GNPs a obesos tratados com salina, na maioria dos tecidos avaliados, exceto no hipocampo e estriado.

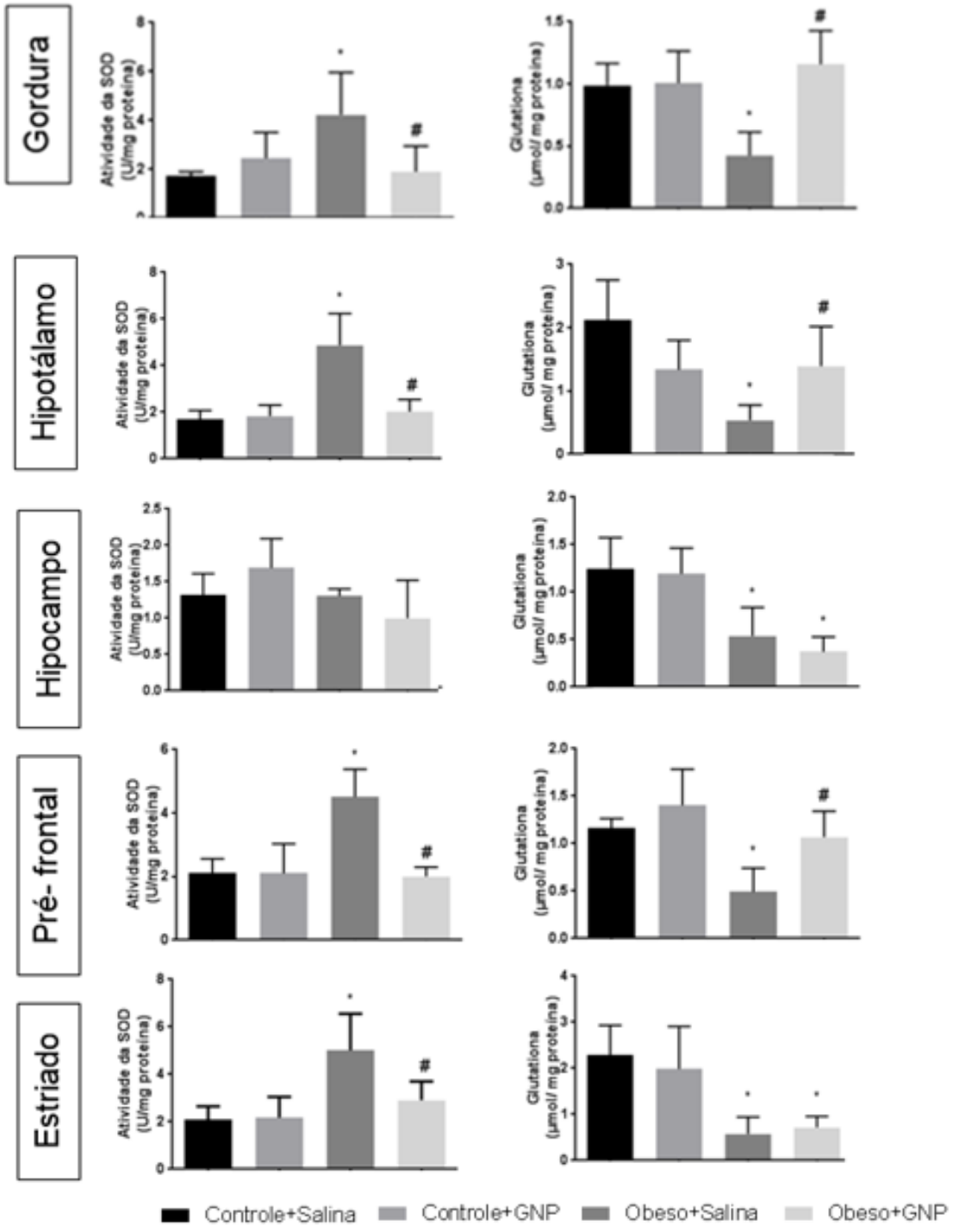

Figura 23 - Efeito da administração de GNPs sobre a atividade antioxidante da SOD e GSH na gordura mesentéroca e estruturas cerebrais de camundongos submetidos a obesidade. Valores expressos em média ± desvio padrão (n=10); * vs. Controle + Salina; # vs. Obeso + Salina; $p<0.05$ (ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey).

Em um estudo com GNPs foram avaliados os efeitos antioxidante da SOD e demonstraram que as GNPs se ligam diretamente ao radical livre, principalmente ao aníon superóxido, neutralizando-o, e que este efeito é dependente da dose, tamanho e da superfície da molécula[178]. Corroborando com esse trabalho, mostrou o mesmo efeito dose-dependente das GNPs como quelante de radicais livres[178]. No trabalho de Yakimovich e colaboradores[178] foi observado que o efeito antioxidante máximo das nanopartículas ocorre no tamanho de 9 nm com concentração de 6%. Além disso, os autores demonstraram que GNPs apresentam uma característica mimética a enzimas antioxidantes, interagindo diretamente com O_2 e radical hidroxila formando subprodutos menos reativos. Considerando que no presente trabalho foi utilizado nanopartículas de tamanho médio de 18 nm, isso pode ter influenciado nos resultados.

A GSH é utilizada como substrato para a GPx eliminar o H_2O_2 e atuar na desintoxicação de aldeídos reativos (como o MDA) que são gerados durante a peroxidação lipídica. Portanto, a manutenção da atividade da GPx e níveis adequados de GSH são de fundamental importância para prevenir danos oxidativos[169]. Os níveis de GSH é ainda mais relevante na mitocôndria, dadas as grandes quantidades de ERO produzidas naquele local. A esse respeito, evidências mostraram que a depleção de GSH mitocondrial contribui para a suscetibilidade ao estresse oxidativo[169]. Wullner e colaboradores[179] mostraram que, nos neurônios cerebelares, a depleção de GSH mitocondrial e citoplasmática resultou em aumento da geração de ERO e comprometimento da função mitocondrial.

Neste sentido, o estresse oxidativo pode levar a alterações mitocondriais[180], onde a cadeia respiratória é responsável por grande parte da produção de energia para as células[181,182]. Alterações em processos relacionados a produção de energia podem levar à disfunção mitocondrial[101], e estudos prévios mostraram que a obesidade está relacionada com esta disfunção[103,183,184].

Considerando que o funcionamento do SNC necessita de grande quantidade energética, e logo depende da correta atividade mitocondrial[91,181,184], foi avaliado neste estudo a atividade dos complexos I e II da cadeia respiratória mitocondrial, por serem as portas de entrada de substratos para atividade mitocondrial[185]. Conforme figura 24, foi verificado redução da atividade dos complexo I e II no grupo obeso, e sem reversão desta inibição pelas GNPs. Dados prévios do nosso grupo de pesquisa mostram não haver alteração na atividade dos complexos da cadeia respiratória

mitocondrial na gordura visceral (dados não publicados). Por este motivo, a cadeia respiratória foi avaliada apenas nas estruturas cerebrais.

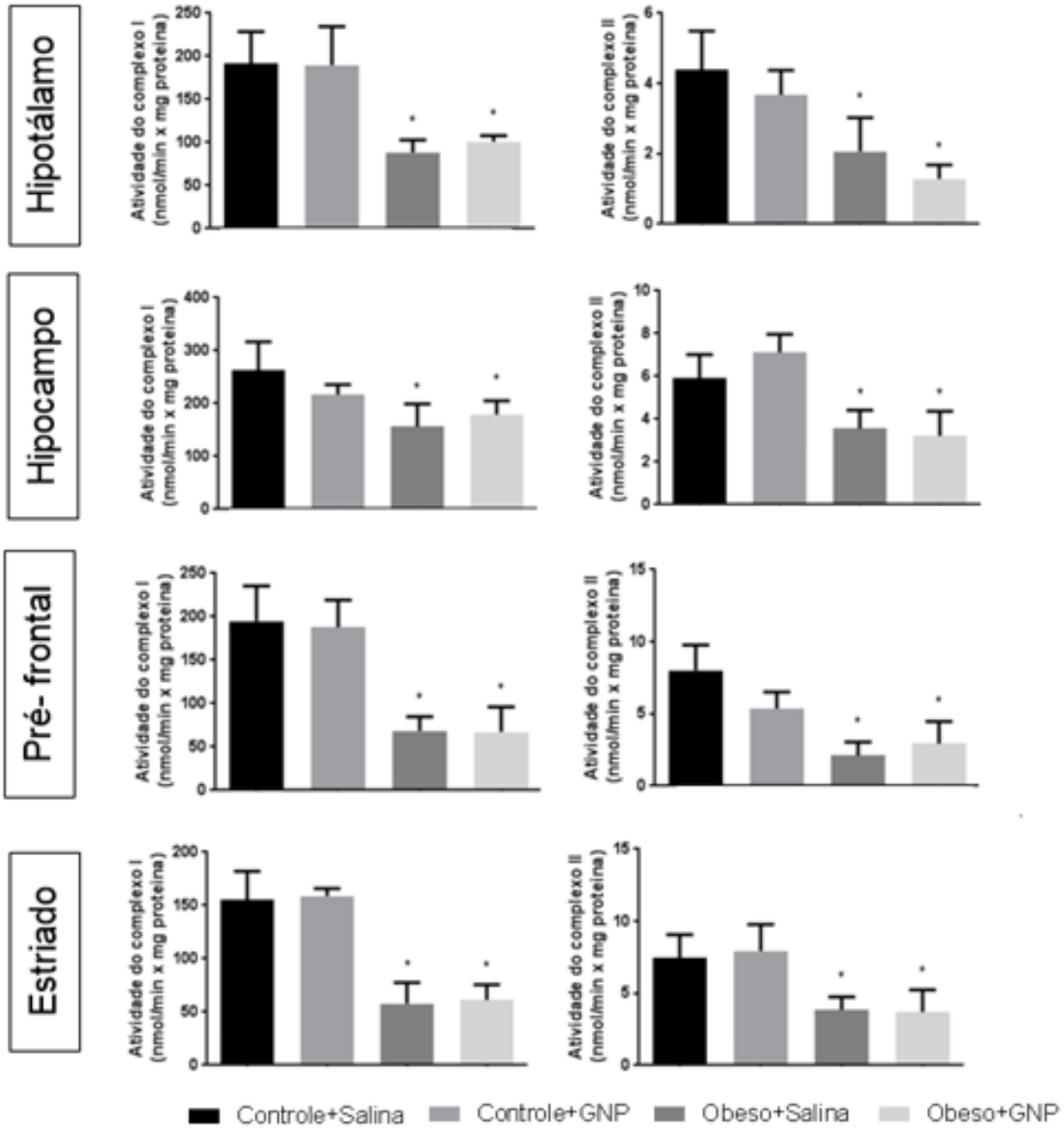

Figura 24 - Figura 24 - Efeito da administração de GNPs sobre a atividade do complexo I e II da cadeia respiratório mitocondrial nas estruturas cerebrais de camundongos submetidos a obesidade. Valores expressos em média ± desvio padrão (n=5); * vs. Controle + Salina; $p<0.05$ (ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey).

A inibição da cadeia respiratória mitocondrial em todas as estruturas cerebrais dos grupos que receberam dieta hiperlípidica, associado aos resultados apresentados anteriormente, vem de encontro com dados de outros estudos[166,186] que mostram que o consumo excessivo de gordura saturada, antes mesmo do acúmulo de gordura coporal, pode levar a ativação do TLR pelos ácidos graxos saturados, o que ativa vias inflamatórias, que podem levar ao estresse oxidativo e à disfunção mitocondrial. Assim, estas alterações em nível cerebral e estruturas relacionadas ao comportamento alimentar pode contribuir para posterior descontrole alimentar, maior consumo de alimentos recompensadores, geralmente ricos em gordura e açúcar, bem como ao acúmulo desse excesso de nutrientes no tecido adiposo, caracterizando a obesidade.

Em resumo e levando em consideração os dados apresentados avaliando cada estrutura isoladamente, o efeito de GNPs mostrou-se satisfatório para tratamento de obesidade. Sendo que na gordura mesentérica houve reversão do perfil inflamatório após administração de GNPs em camungondos que receberam dieta hiperlípídica, com redução da expressão de TNF-α e IL-1β e aumentou expressão de IL-10, redução de dano oxidativo, apresentando reversão dos níveis de DCF e proteína carbonilada, e ainda aumento dos níveis de GSH. Estes dados indicam que o uso de GNPs atuando na gordura corporal pode ser uma alternativa terapêutica para obesidade que evitaria o descontrole metabólico apresentado por esta doença e desencadeado pela inflamação do tecido adiposo.

No hipotálamo, foi possível observar também, após administração de GNPs em animais que receberam dieta hiperlípica, melhora do perfil inflamatório com redução na expressão de TNF-α e aumento de IL-10, além de redução de dano oxidativo com menor níveis de DCF e proteínas carboniladas e aumento dos níveis de GSH. Estes dados são bastante relevantes, devido o hipotálamo ser estrutura central de controle alimentar, atuando através da sinalização de neurônios anorexígenos e orexigenos como centro da sacidade, e alterações em suas funções estão diretamente ligadas a causa e agravamento da obesidade[68], e assim o uso de GNPs poderia controlar estas alterações de forma benéfica.

Alterações no hipocampo podem trazer prejuízo no aprendizado e memória[144], e nosso estudo observou que após administração de GNPs em animais recebendo dieta hiperlípica, houve reversão do perfil inflamatório encontrado, com redução da

expressão de TNF-α e IL-1β e aumento da expressão de IL-10, bem como estresse oxidativo, observado através da redução nos níveis de proteína carboniladas e DCF.

E por fim as estruturas cerebrais, córtex pré-frontal e estriado que estão ligadas ao sistema de recompensa, bastante envolvido na obesidade, onde indivíduos obesos podem ser mais sensíveis às propriedades de recompensa do alimento, tornando-se propensos a comer mais por impulso que pela tomada de decisão[40]. Em nosso estudo após administração de GNPs em animais recebendo dieta hiperlípica, estes tiveram melhora do perfil inflamatório, com redução da expressão de TNF-α e IL-1β e aumento de IL-10. Quanto ao estresse oxidativo, os níveis de proteínas carboniladas foi reduzido no pré-frontal, e níveis de DCF reduzido tanto no córtex pré-frontal quanto no estriado. Em ambas as estruturas avaliadas do sistema de recompensa houve redução da atividade da SOD, porém o aumento dos níveis de GSH ocorreu apenas no cortéx pré-frontal.

Considerando que efeito benéfico na função de estruturas envolvidas no controle da saciedade, aprendizado, memória e sistema recompensa podem evitar alterações comportamentais envolvidas na obesidade, como descontrole alimentar. Assim, nosso estudo mostrou efeito positivo da ação de GNPs nestas estruturas em animais que receberam dieta hiperlípica e, desta forma, poderia ser uma alterantiva terapêutica para evitar o desenvolvimento de obesidade.

5. CONCLUSÃO

Este estudo sugere que GNPs administradas intraperitonial em camundongos chegam ao tecido adiposo, cérebro, fígado e rim, e que não indica dano hepático ou renal. Desta forma, indica segurança no seu uso, e que poderia ser empregado para finalidades terapêuticas. Além disso, nosso estudo mostrou que a administração de GNPs em animais obesos reduziu a ingestão alimentar, mesmo sem alterar o peso corporal e peso da gordura visceral. Assim, indica efeito promissor das GNPs na obesidade, pois redução da ingestão alimentar ao longo do tempo pode levar a redução de peso e controle da obesidade. Os demais dados confirmam que a inflamação, o estresse oxidativo e a disfunção mitocondrial estão intimamente relacionados ao alto consumo de gordura saturada e quadro de obesidade. Neste sentido, também mostramos que GNPs podem auxiliar no tratamento da obesidade por possuem efeito anti-inflamatório e antioxidante.

REFERÊNCIAS

1. World Health Organization. Obesity. World Health Organization. [acesso em 2018 Jun 20]. Disponível em: http://www.who.int/topics/obesity/en/

2. Zeeni N, Dagher-Hamalian C, Dimassi H, Faour WH. Cafeteria diet-fed mice is a pertinent model of obesity-induced organ damage: a potential role of inflammation. Inflamm. Res. 2015; 64(7):501–12.

3. Jung CH, Kim M-S. Molecular mechanisms of central leptin resistance in obesity. Arch. Pharm. Res. 2013; 36(2):201–7. Epub 2013 Jan 29.

4. Souza T De, Araujo EP, Bordin S, Ashimine R, Zollner RL, Boschero AC, et al. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin. Endocrinology. 2016;146:4192–9.

5. Milanski M, Degasperi G, Coope A, Morari J, Denis R, Cintra DE, et al. Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus : implications for the pathogenesis of obesity. Journal of Neuroscience. 2009;29(2):359–70.

6. Moraes JC, Coope A, Morari J, Cintra DE, Roman EA, Carvalheira B, et al. High-fat diet induces apoptosis of hypothalamic neurons. PloS One. 2009;4(4).

7. Haslam DW, James WPT. Obesity. 2005;366:1197–209.

8. Janssen I, Katzmarzyk PT, Ross R. Waist circumference and not body mass index explains obesity- related health risk 1 – 3. The American journal of clinical nutrition. 2004;5–7.

9. Quigley JE, Elmarakby AA, Knight SF, Manhiani MM, Stepp DW, Olearzcyk JJ, et al. Obesity induced renal oxidative stress contributes to renal injury in salt-sensitive hypertension. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2009;36(7):724–8.

10. Crowe S, Turpin SM, Ke F, Kemp BE, Watt MJ. Metabolic remodeling in adipocytes promotes ciliary neurotrophic factor-mediated fat loss in obesity. Endocrinology. 2016;149(5):2546–56.

11. van Erk MJ, Wopereis S, Rubingh C, van Vliet T, Verheij E, Cnubben NHP, et al. Insight in modulation of inflammation in response to diclofenac intervention: a human intervention study. BMC Med Genomics. 2010;3:5.

12. Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory mechanisms in obesity. Annu Ver Immunol. 2011;29:415-45.

13. Thaler J, Yi C, Schur E, Guyenet S, Hwang B, Dietrich M, et al. Obesity is associated with hipothalamic injury in rodents and humans. J Clin Investig. 2005;122(1):153.

14. Williams LM. Hypothalamic dysfunction in obesity. Rev Neurosci. 2012;71(4):521–33.

15. Boitard C, Cavaroc A, Sauvant J, Aubert A, Castanon N, Layé S, et al. Impairment of hippocampal-dependent memory induced by juvenile high-fat diet intake is associated with enhanced hippocampal inflammation in rats. Brain Behav Immun. 2014;40:9–17.

16. Sobesky JL, Barrientos RM, De May HS, Thompson BM, Weber MD, Watkins LR, et al. High-fat diet consumption disrupts memory and primes elevations in hippocampal IL-1β, an effect that can be prevented with dietary reversal or IL-1 receptor antagonism. Brain Behav Immun. 2014;42:22–32.

17. Stranahan AM. Models and mechanisms for hippocampal dysfunction in obesity and diabetes. Neuroscience. 2015;309:125–39.

18. Nummenmaa L, Hirvonen J, Hannukainen JC, Immonen H, Lindroos MM, Salminen P, et al. Dorsal striatum and its limbic connectivity mediate abnormal anticipatory reward processing in obesity. PLoS One. 2012;7(2):e31089.

19. Tomasi D, Volkow ND. Striatocortical pathway dysfunction in addiction and obesity: differences and similarities. Crit Rev Biochem Mol Biol. 2013;48(1):1–19.

20. Farr OM, Li CR, Mantzoros CS. Central nervous system regulation of eating: Insights from human brain imaging. Metabolism. 2016;65(5):699–713.

21. Guillemot-Legris O, Muccioli GG. Obesity-Induced Neuroinflammation: Beyond the Hypothalamus. Trends Neurosci. 2017;40(4):237–53.

22. Velloso LA, Schwartz MW. Altered hypothalamic function in diet-induced obesity. Int J Obes. 2011;35(12):1455–65.

23. Shefer G, Marcus Y, Stern N. Is obesity a brain disease? Neurosci Biobehav Rev. 2013;37(10):2489–503.

24. Pauli R, Morari J, Claudio T, Cintra DE, Ropelle ER, Moraes JC, et al. Unsaturated Fatty Acids Revert Diet-Induced Hypothalamic Inflammation in Obesity. PLoS One. 2012;7(1).

25. Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica (ABESO). Diretrizes brasileiras de obesidade 2016 / ABESO. 4rd ed. Itapevi: AC Farmacêutica; 2016. Disponível em: http://www.abeso.org.br/uploads/downloads/92/57fccc403e5da.pdf

26. Kirk SFL, Penney TL, McHugh T-LF, Sharma AM. Effective weight management practice: a review of the lifestyle intervention evidence. Int J Obes. 2012;36(2):178–85.

27. Martins ELM, do Amaral MPH, Ferreira MBC, de Mendonça AÉ, Pereira MCS, Pereira DC, et al. Dispensações de psicotrópicos anorexígenos no município de Juiz de fora, Minas Gerais, Brasil. Cienc e Saude Coletiva. 2012;17(12):3331–42.

28. Boaz M, Lisy L, Zandman-Goddard G, Wainstein J. The effect of anti-inflammatory (aspirin and/or statin) therapy on body weight in Type 2 diabetic individuals: EAT, a retrospective study. Diabet Med. 2009;26(7):708–13.

29. Ghosh P, Han G, De M, Kim CK, Rotello VM. Gold nanoparticles in delivery applications. Adv Drug Deliv Rev. 2008;60(11):1307–15.

30. Victor EG, Silveira PCL, Possato JC, da Rosa GL, Munari UB, de Souza CT, et al. Pulsed ultrasound associated with gold nanoparticle gel reduces oxidative stress parameters and expression of pro-inflammatory molecules in an animal model of muscle injury. J Nanobiotechnology. 2012;10(1):11.

31. Hu YL, Gao JQ. Potential neurotoxicity of nanoparticles. Int J Pharm. 2010;394(1–2):115–21.

32. Chen H, Dorrigan A, Saad S, Hare DJ, Cortie MB, Valenzuela SM. In Vivo Study of Spherical Gold Nanoparticles: Inflammatory Effects and Distribution in Mice. PLoS One. 2013;8(2).

33. Letícia VC. Estudo da Clarificação da lecitina de soja. Dissertação [Mestrado em Engenharia Quimica] - Universidade Federeal de Urbelandia; 2010.

34. Lemieux I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. Nature. 2006;444:881–7.

35. Rui L. Brain regulation of energy balance and body weight. Rev Endocr Metab Disord. 2013;14(4):387–407.

36. Tchernof A, Després J-P. Pathophysiology of Human Visceral Obesity: An Update. Physiol Rev. 2013;93(1):359–404.

37. Walker GE, Marzullo P, Ricotti R, Bona G, Prodam F. The pathophysiology of abdominal adipose tissue depots in health and disease. Horm Mol Biol Clin Investig. 2014;19(1):57–74.

38. International Association of Obesitu Studies - IASO. Obesity : Understanding and challenging the global epidemic. 2009 / 2010. [acesso em 2017 Out 15] Disponível em: http://blogimages.bloggen.be/diabetescheck/attach/35623.pdf

39. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância de Doenças e Agravos não Transmissíveis e Promoção da Saúde. Vigitel Brasil 2013: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Brasília: Ministério da Saúde, 2014. [acesso em 2017 Out 19]. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigitel_brasil_2013.pdf

40. Landeiro F, Quarantini L. Obesidade: Controle Neural e Hormonal do Comportamento Alimentar. Rev Ciências Médicas e Biológicas. 2012;236–45.

41. Caimari A, Oliver P, Rodenburg W, Keijer J, Palou A. Feeding conditions control the expression of genes involved in sterol metabolism in peripheral blood mononuclear cells of normoweight and diet-induced (cafeteria) obese rats. J Nutr Biochem. 2010;21(11):1127–33.

42. Costa J V, Duarte JS. Tecido adiposo e adipocinas. Acta Med Port. 2006;19(3):251–6.

43. Lopez IP, Marti A, Milagro FI, Zulet ML, Moreno-Aliaga MJ, Martinez JA, et al. DNA microarray analysis of genes differentially expressed in diet-induced (cafeteria) obese rats. Obes Res. 2003;11(2):188–94.

44. Bruce-Keller AJ, Keller JN, Morrison CD. Obesity and vulnerability of the CNS. Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis. 2009;1792(5):395–400.

45. Sethi JK, Vidal-Puig AJ. Thematic review series: adipocyte biology. Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation. J Lipid Res. 2007;48(6):1253–62.

46. Cesaretti MLR, Kohlmann Junior O. Modelos experimentais de resistência à insulina e obesidade: lições aprendidas. Arq Bras Endocrinol Metabol. 2006;50(2):190–7.

47. Münzberg H, Myers MG. Molecular and anatomical determinants of central leptin resistance. Nat Neurosci. 2005;8(5):566–70.

48. Jéquier E. Leptin signaling, adiposity, and energy balance. Ann N Y Acad Sci. 2002;967:379–88.

49. Ahima RS, Lazar MA. Adipokines and the peripheral and neural control of energy balance. Mol Endocrinol. 2008;22(5):1023–31.

50. Belgardt BF, Brüning JC. CNS leptin and insulin action in the control of energy homeostasis. Ann N Y Acad Sci. 2010;1212:97–113.

51. Sangiao-Alvarellos S, Pena-Bello L, Manfredi-Lozano M, Tena-Sempere M, Cordido F. Perturbation of hypothalamic microrna expression patterns in male rats after metabolic distress: Impact of obesity and conditions of negative energy balance. Endocrinology. 2014;155(5):1838–50.

52. Johnson AR, Justin Milner J, Makowski L. The inflammation highway: Metabolism accelerates inflammatory traffic in obesity. Immunol Rev. 2012;249(1):218–38.

53. Sakurai T, Izawa T, Kizaki T, Ogasawara J, Shirato K, Imaizumi K, et al. Exercise training decreases expression of inflammation-related adipokines through reduction of oxidative stress in rat white adipose tissue. Biochem Biophys Res Commun. 2009;379(2):605–9.

54. Noeman SA, Hamooda HE, Baalash AA. Biochemical study of oxidative stress markers in the liver, kidney and heart of high fat diet induced obesity in rats. Diabetol Metab Syndr. 2011;3(1):17.

55. de Farias JM, Bom KF, Tromm CB, Luciano TF, Marques SO, Tuon T, et al. Effect of physical training on the adipose tissue of diet-induced obesity mice: interaction between reactive oxygen species and lipolysis. Horm Metab Res. 2013;45(3):190–6.

56. Barouch LA, Gao D, Chen L, Miller KL, Xu W, Phan AC, et al. Cardiac myocyte apoptosis is associated with increased DNA damage and decreased survival in murine models of obesity. Circ Res. 2006;98(1):119–24.

57. Al-Aubaidy HA, Jelinek HF. Oxidative DNA damage and obesity in type 2 diabetes mellitus. Eur J Endocrinol. 2011;164(6):899–904..

58. Ritov VB, Menshikova E V., He J, Ferrell RE, Goodpaster BH, Kelley DE. Deficiency of subsarcolemmal mitochondria in obesity and type 2 diabetes. Diabetes. Diabetes. 2005;54(1):8–14.

59. Buckman LB, Hasty AH, Flaherty DK, Buckman CT, Thompson MM, Matlock BK, et al. Obesity induced by a high-fat diet is associated with increased immune cell entry into the central nervous system. Brain Behav Immun. 2014;35:33–42.

60. Lee B, Lee J. Cellular and molecular players in adipose tissue inflammation in the development of obesity-induced insulin resistance. BBA - Mol Basis Dis. 2014;1842(3):446–62.

61. Revis ADE, Leite D, Rocha DDM. Obesidade : uma doença inflamatória Obesity: an inflammatory disease. :85–95.

62. Cai D, Liu T. Inflammatory cause of metabolic syndrome via brain stress and NF-kB. Aging. 2012;4(2):98–115.

63. Van De Sande-Lee S, Pereira FRS, Cintra DE, Fernandes PT, Cardoso AR, Garlipp CR, et al. Partial reversibility of hypothalamic dysfunction and changes in brain activity after body mass reduction in obese subjects. Diabetes. 2011;60(6):1699–704.

64. Marqués-Iturria I, Pueyo R, Garolera M, Segura B, Junqué C, García-García I, et al. Frontal cortical thinning and subcortical volume reductions in early adulthood obesity. Psychi. Psychiatry Res Neuroimaging. 2013;214:109–15.

65. Debette S, Wolf C, Lambert J-C, Crivello F, Soumaré A, Zhu Y-C, et al. Abdominal obesity and lower gray matter volume: a Mendelian randomization study. Neurobiol Aging. 2014;35(2):378–86.

66. Klaus F, Paterna J-C, Marzorati E, Sigrist H, Götze L, Schwendener S, et al. Differential effects of peripheral and brain tumor necrosis factor on inflammation, sickness, emotional behavior and memory in mice. Brain, Behavoir, and Immunity. 2016;58:310-326.

67. Machado, A; Haertel LM. Neuroanatomia Funcional. 3ed. Atheneu, Brasil, 2012.

68. Schneeberger M, Gomis R, Claret M. Hypothalamic and brainstem neuronal circuits controlling homeostatic energy balance. J Endocrinol. 2014;220(2).

69. Broadwell RD, Brightman MW. Entry of peroxidase into neurons of the central and peripheral nervous systems from extracerebral and cerebral blood. J Comp Neurol. 1976;166(3):257–83.

70. Gehlert DR, Chronwall BM, Schafer MP, O'Donohue TL. Localization of neuropeptide Y messenger ribonucleic acid in rat and mouse brain by in situ hybridization. Synapse. 1987;1:25–31.

71. Gupta S, Knight AG, Gupta S, Keller JN, Bruce-Keller AJ. Saturated long-chain fatty acids activate inflammatory signaling in astrocytes. J Neurochem. 2012;120(6):1060–71.

72. Tilg H, Moschen AR. Adipocytokines: Mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. Nat Rev Immunol. 2006;6(10):772–83.

73. Shen H-M. TNF receptor superfamily-induced cell death: redox-dependent execution. FASEB J. 2006;20(10):1589–98.

74. Vazzana N, Santilli F, Sestili S, Cuccurullo C, Davi G. Determinants of Increased Cardiovascular Disease in Obesity and Metabolic Syndrome. Curr Med Chem. 2011;18(34):5267–80.

75. Santilli F, Guagnano MT, Vazzana N, La Barba S, Davi G. Oxidative stress drivers and modulators in obesity and cardiovascular disease: from biomarkers to therapeutic approach. Curr Med Chem. 2015;22(5):582–95.

76. Marseglia L, Manti S, D'angelo G, Nicotera A, Parisi E, Rosa G Di, et al. Oxidative Stress in Obesity: A Critical Component in Human Diseases. Int J Mol Sci. 2015;16:378–400.

77. Hüttemann M, Lee I, Pecinova A, Pecina P, Przyklenk K, Doan JW. Regulation of oxidative phosphorylation, the mitochondrial membrane potential, and their role in human disease. J Bioenerg Biomembr. 2008;40(5):445–56.

78. Gough DR, Cotter TG. Hydrogen peroxide: a Jekyll and Hyde signalling molecule. Cell Death Dis. 2011;2(10):e213.

79. Ferreira AL, Matsubara LS. Free radicals: concepts, associated diseases, defense system and oxidative stress. Rev da Assoc Médica Bras. 2014;43(1):61–8.

80. Thannickal VJ, Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2000;279(6):L1005-28.

81. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine. 5th ed. Oxford: Oxford Univ; 2015

82. Gutteridge JM, Halliwell B. Free radicals and antioxidants in the year 2000: A historical look to the future. Ann N Y Acad Sci. 2000;899:136–47.

83. Beal MF. Aging, energy, and oxidative stress in neurodegenerative diseases. Ann Neurol. 1995;38(3):357–66.

84. Cardoso É. Efeitos da administração de nanopartículas de ouro sobre parâmetros bioquímicos em cérebro de ratos. Criciúma. Tese [Doutorado em Ciências da Saúde] - Universidade do Extremo Sul de Santa Catarina - UNESC; 2014.

85. Ozgen IT, Tascilar ME, Bilir P, Boyraz M, Guncikan MN, Akay C, et al. Oxidative stress in obese children and its relation with insulin resistance. J Pediatr Endocrinol Metab. 2012;25(3–4):261–6.

86. Olza J, Gil-Campos M, Leis R, Mesa MD, Tojo R, et al. Are catalase -844A/G polymorphism and activity associated with childhood obesity? Antioxid Redox Signal. 2013;19(16):1970–5.

87. Keaney JF, Larson MG, Vasan RS, Wilson PWF, Lipinska I, Corey D, et al. Obesity and systemic oxidative stress: Clinical correlates of oxidative stress in the Framingham study. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2003;23(3):434–9.

88. Bajnok L, Seres I, Varga Z, Jeges S, Peti A, Karanyi Z, et al. Relationship of endogenous hyperleptinemia to serum paraoxonase 1, cholesteryl ester transfer protein, and lecithin cholesterol acyltransferase in obese individuals. Metabolism. 2007;56(11):1542–9.

89. Freeman LR, Zhang L, Nair A, Dasuri K, Francis J, Fernandez-Kim SO, et al. Obesity increases cerebrocortical reactive oxygen species and impairs brain function. Free Radic Biol Med. 2013;56:226-33.

90. Barbosa KBF, Costa NMB, De Cássia Gonçalves Alfenas R, De Paula SO, Minim VPR, Bressan J. Estresse oxidativo: Conceito, implicações e fatores modulatórios. Rev Nutr. 2010;23(4):629–43.

91. Ma W, Yuan L, Yu H, Xi Y, Xiao R. Mitochondrial dysfunction and oxidative damage in the brain of diet-induced obese rats but not in diet-resistant rats. Life Sci. 2014;110(2):53–60.

92. Clark JB, Bates TE, Cullingford T, Land JM. Development of enzymes of energy metabolism in the neonatal mammalian brain. Dev Neurosci. 1993;15(3–5):174–80.

93. Nelson, David L.; Cox M. Principios de Bioquímica de Lehninger. 6th ed. Porto Alegre: Artmed; 2014.

94. Lehninger AL, Nelson DL CM. Lehninger: princípios de bioquímica. 3rd ed. São Paulo: Worth; 2002.

95. Erecińska M, Dagani F. Relationships between the neuronal sodium/potassium pump and energy metabolism: Effects of K+, Na+, and adenosine triphosphate in isolated brain synaptosomes. J Gen Physiol. 1990;95(4):591–616.

96. Wallace DC. Mitochondrial diseases in man and mouse. Science. 1999;283(5407):1482–8.

97. Ohara A. Radicais Livres. Bons, Maus e Naturais. São Paulo: Oficina de Textos; 2006.

98. Beal MF. MiniReview: Bioenergetic and Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. Life Sci. 1995;56(14):1151–71.

99. Bournat JC, Brown CW. Mitochondrial dysfunction in obesity. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes. 2010;17(5):446-52.

100. Cheng Z, Almeida FA. Mitochondrial alteration in type 2 diabetes and obesity: An epigenetic link. Cell Cycle. 2014;13(6):890–7.

101. Kusminski CM, Scherer PE. Mitochondrial dysfunction in white adipose tissue. Trends Endocrinol Metab. 2012;23(9):435–43.

102. Rong JX, Qiu Y, Hansen MK, Zhu L, Zhang V, Xie M, et al. Adipose Mitochondrial Biogenesis Is Suppressed in db / db. Diabetes. 2007;56:1751–60.

103. Putti R, Sica R, Migliaccio V, Lionetti L. Diet impact on Mitochondrial Bioenergetics and Dynamics. Front Physiol. 2015;6:1–7.

104. Zorzano A, Liesa M, Palacín M. Role of mitochondrial dynamics proteins in the pathophysiology of obesity and type 2 diabetes. Int J Biochem Cell Biol. 2009;41(10):1846–54.

105. Ministério da Saúde. RESOLUÇÃO-RDC N° 50, DE 25 DE SETEMBRO DE 2014. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. 2014. [acesso em 2017 Jun 15]. Disponível em:http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/reprdc0050_25_09_2014.pdf/d04dec76-4dbb-4d04-a721-50bd191a1a9b?version=1.0

106. Ministério da Saúde. Liraglutida é aprovada como tratamento auxiliar para o controle do peso em adultos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. 2016. [acesso em 2017 Jun 22]. Disponível em: https://www.news.med.br/p/pharma-news/821004/anvisa-aprova-a-liraglutida-como-tratamento-auxiliar-para-o-controle-do-peso-em-adultos-obesos.htm.

107. Ministério da Saúde. Medicamentos femproporex, mazindol e anfepramona não podem ser vendidos no Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. 2017. [acesso em 2017 Nov 10]. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/anvisa+portal/anvisa/sala+de+imprensa/menu+-+noticias+anos/2011+noticias/medicamentos+femproporex+mazindol+e+anfepramona+nao+podem+ser+vendidos+no+brasil.

108. Kirk SFL, Penney TL, McHugh T-L, Sharma AM. Effective weight management practice: a review of the lifestyle intervention evidence. Int J Obes. 2012;36(2):178–85.

109. Thomas SL, Hyde J, Karunaratne A, Kausman R, Komesaroff PA. “They all work...when you stick to them”: a qualitative investigation of dieting, weight loss, and physical exercise, in obese individuals. Nutr J. 2008;7:34.

110. Martins MDCDCE, Souza Filho MD De, Moura FS, Carvalho JDSR De, Müller MC, Neves RV, et al. Uso de drogas antiobesidade entre estudantes universitários. Rev Assoc Med Bras. 2011;57(5):570–6.

111. Junta Internacional de Fiscalização de Entorpecentes. Relatório Anual 2003. Junta Internacional de Fiscalização de Entorpecentes. 2013. [acesso em 2017 Nov 18]. Disponível em: http://www . unodc.org/lpobrazil/pt/drogas/ jife.html. 2013.

112. Associação Brasileira para Estudo da Obesidade e da Sindrome Metabólica (ABESO). Novo Emagrecedor -uso off label. [acesso em 2017 Dez 08]. Disponível em: http://www.abeso.org.br/comunicacao/novo-emagrecedor.

113. Bystrzejewska-Piotrowska G, Golimowski J, Urban PL. Nanoparticles: Their potential toxicity, waste and environmental management. Waste Manag. 2009;29(9):2587–95.

114. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diagnóstico Institucional de Nanotecnologia. 2014. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. [acesso em: 2015 jun 10]. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps.wcm/connect/fb117d80436cacb1b5b72a04b41f5/D+Dicol.pdf?MOD=AJPERES.

115. Corma A, Hermenegildo G. Supported gold nanoparticles as catalysts for organic reactions. Chem Soc Rev. 2008;37(9):1909–30.

116. Fischer HC, Chan WC. Nanotoxicity: the growing need for in vivo study. Curr Opin Biotechnol. 2007;18(6):565–71.

117. Chen Z, Meng H, Xing G, Chen C, Zhao Y, Jia G, et al. Acute toxicological effects of copper nanoparticles in vivo. Toxicol Lett. 2006;163(2):109–20.

118. Tedesco S, Doyle H, Blasco J, Redmond G, Sheehan D. Oxidative stress and toxicity of gold nanoparticles in Mytilus edulis. Aquat Toxicol. 2010;100(2):178–86.

119. Jain PK, Huang X, El-Sayed IH, El-Sayed MA. Review of some interesting surface plasmon resonance-enhanced properties of noble metal nanoparticles and their applications to biosystems. Plasmonics. 2007;2(3):107–18.

120. Pereira DV, Petronilho F, Pereira HRSB, Vuolo F, Mina F, Possato JC, et al. Effects of gold nanoparticles on endotoxin-induced uveitis in rats. Investig Opthalmology Vis Sci. The Association for Research in Vision and Ophthalmology; 2012;53(13):8036.

121. Feltes MMC. Produção de monoacilgliceróis e diacilgliceróis ricos em ácidos graxos ômega-3 a partir de glicerólise enzimática de óleo de peixe. Tese [Doutorado em Engenharia de Alimentos] - Universidade Federal de Santa Catarina; 2011.

122. Rodrigues MDP. Novas percepções sobre o uso de lecitina de soja na criopreservação e fertilidade de espermatozoide bovino. São Paulo. Tese [Doutorado em Reprodução Animal] - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo; 2014.

123. Moretto E, Fett R. Tecnologia de óleos e gorduras vegetais na Indústria de Alimentos. Livraria Varela: São Paulo; 1998.

124. Marconcin AS, Rose P, Lenati L, Vitória A. Suplementação de lecitina de soja na ração de cães: estudo sobre o perfil hematológico. Ver Acadêmica: Ciência Animal. 2009;7(3):289–97.

125. Vissotto FZ, Montenegro FM, Santos JM Dos, Oliveira SJR De. Avaliação da influência dos processos de lecitinação e de aglomeração nas propriedades físicas de achocolatado em pó. Ciência e Tecnol Aliment. 2006;26(3):666–71.

126. Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos da América N. Principles of Laboratory Animal Care. 80-23. 1996.

127. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Vasa. 2013;1–50.

128. Turkevich J, Stevenson PC, Hillier J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. Discuss Faraday Soc. 1951;11(0):55.

129. Cardoso E, Rezin GT, Zanoni ET, de Souza Notoya F, Leffa DD, Damiani AP, et al. Acute and chronic administration of gold nanoparticles cause DNA damage in the cerebral cortex of adult rats. Mutat Res. 2013;766–767:25–30.

130. Yan W, Petkov V, Mahurin SM, Overbury SH, Dai S. Powder XRD analysis and catalysis characterization of ultra-small gold nanoparticles deposited on titania-modified SBA-15. Catal Commun. 2005;6(6):404–8.

131. Paula MMS, Petronilho F, Vuolo F, Ferreira GK, De Costa L, Santos GP, et al. Gold nanoparticles and/or n-acetylcysteine mediate carrageenan-Induced inflammation and oxidative stress in a concentration-dependent manner. J Biomed Mater Res - Part A. 2015;3323–30.

132. Cardoso E, Rezin GT, Zanoni ET, de Souza Notoya F, Leffa DD, Damiani AP, et al. Acute and chronic administration of gold nanoparticles cause DNA damage in the cerebral cortex of adult rats. Mutat Res. 2014;766–767:25–30.

133. Calderon HL, Carvalho AJP, Oliveira ICR, Soares EA, Loyola YCS, Santos L, et al. Efeito da lecitina de soja sobre os lipídeos e proteína C reativa e na prevenção da hipertrofia ventricular esquerda de camundongos Hiperlipidêmicos. Rev Ciencias Farm Basica e Apl. 2011;32(3):389–93.

134. Conselho Federal de Medicina Veterinária. Resolução No 1000. Conselho Federal de Medicina Veterinária. 2012. 2012;1–9.

135. Brasil. Lei Federal 11.794 de 08/10/2008. Comissão de ética no uso de animais. Diário Oficial da União - Seção 1 - 9 out 2008, Página 1.

136. Kalupahana N, Claycombe K. Eicosapentaenoic acid prevents and reverses insulin resistance in high-fat diet-induced obese mice via modulation of adipose tissue inflammation. J Nutr. 2010;1915–22.

137. Nilsson C, Raun K, Yan F, Larsen MO, Tang-Christensen M. Laboratory animals as surrogate models of human obesity. Acta Pharmacol Sin. 2012;33(2):173–81.

138. Chorilli M, Michelin DC, Salgado HRN. Animais de laboratório: O camundongo. Rev Ciencias Farm Básica e Apl. 2007;28(1):11–23.

139. Razolli DS, Moraes JC, Morari J, Moura RF, Vinolo MA, Velloso LA. TLR4 expression in bone marrow-derived cells is both necessary and sufficient to produce the Insulin resistance phenotype in diet-induced obesity. Endocrinology. 2015;156(1):103–13.

140. Johnson PR, Hirsch J. Cellularity of adipose depots in six strains of genetically obese mice. J Lipid Res. 1972;13:2–11.

141. Hansen PA, Han DH, Nolte LA, Chen M, Holloszy JO. DHEA protects against visceral obesity and muscle insulin resistance in rats fed a high-fat diet. Am J Physiol. 1997;273(5 Pt 2):R1704-8.

142. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. Clin Chem. 1972;18:499-502.

143. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall JR. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 1951;193(1):265–75.

144. Dong J, Sulik KK, Chen S-Y. The role of NOX enzymes in ethanol-induced oxidative stress and apoptosis in mouse embryos. Toxicol Lett. 2010;193(1):94.

145. Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. Methods Enzymol. 1994;233:346–57.

146. Bannister J V, Calabrese L. Assays for superoxide dismutase. Methods Biochem Anal. 1987;32:279–312.

147. Cassina A, Radi R. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. Arch Biochem Biophys. 1996;328(2):309–16.

148. Fischer JC, Ruitenbeek W, Berden JA, Trijbels JM, Veerkamp JH, Stadhouders AM, et al. Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. Clin Chim Acta. 1985;153(1):23–36.

149. Toderas F, Iosin M, Astilean S. Luminescence properties of gold nanorods. Nucl Instruments Methods Phys Res Sect B Beam Interact with Mater Atoms. 2009;267(2):400–2.

150. Sun Y, Gates B, Mayers B, Xia Y. Crystalline Silver Nanowires by Soft Solution Processing. NANO Lett; 2002;2(2):59.

151. Ferreira GK, Cardoso E, Vuolo FS, Galant LS, Michels M, Gonçalves CL, et al. Effect of acute and long-term administration of gold nanoparticles on biochemical parameters in rat brain. Mater Sci Eng C. 2017;79:748–55.

152. Rambanapasi C, Zeevaart J, Buntting H, Bester C, Kotze D, Hayeshi R, et al. Bioaccumulation and subchronic toxicity of 14 nm gold nanoparticles in rats. Molecules. 2016;21(6):763.

153. Lasagna-Reeves C, Gonzalez-Romero D, Barria MA, Olmedo I, Clos A, Sadagopa Ramanujam VM, et al. Bioaccumulation and toxicity of gold nanoparticles after repeated administration in mice. Biochem Biophys Res. 2010;393(4):649–55.

154. Zhang X-D, Wu D, Shen X, Liu P-X, Yang N, Zhao B, et al. Size-dependent in vivo toxicity of PEG-coated gold nanoparticles. Int J Nanomedicine. 2011;6:2071–81.

155. Daniel D, Rodrigo E, J M. Efectos de una dieta con alto contenido de grasas sobre patrones conductuales alimentarios. Acta Colomb. Psicol. 2018;21(1):106–15.

156. Chen H, Dorrigan A, Saad S, Hare DJ, Cortie MB, Valenzuela SM. In Vivo Study of Spherical Gold Nanoparticles: Inflammatory Effects and Distribution in Mice. PLoS One. 2013;8(2).

157. Storlien LH, James DE, Burleigh KM, Chisholm DJ, Kraegen EW. Fat feeding causes widespread in vivo insulin resistance, decreased energy expenditure, and obesity in rats. Am J Physiol Metab. 1986;251(5):E576–83.

158. Vasdev S, Longerich L, Gill V. Prevention of fructose-induced hypertension by dietary vitamins. Clin Biochem. 2004;37(1):1–9.

159. Muller AP, Ferreira GK, da Silva S, Nesi RT, de Bem Silveira G, Mendes C, et al. Safety protocol for the gold nanoparticles administration in rats. Mater Sci Eng C. 2017;77:1145–50.

160. Mendy VL, Vargas R, El-sadek L, Short VL. Declining prevalence of no known major risk factors for heart disease and stroke among adults.Morb Mortal Wkly Rep. 2004;53(1):4–7.

161. Faludi AA, Izar MCO, Saraiva JFK, Chacra APM, Bianco HT, Afiune Neto A, et al. Atualização da diretriz Brasileira de displipidemias e prevenção da aterosclerose - 2017. Arquivos Brasileiros de Cardiologia. 2017;109(2).

162. Clifton PM, Nestel PJ. Influence of gender, body mass index, and age on response of plasma lipids to dietary fat plus cholesterol. Arterioscler Thromb A J Vasc Bio. 1992;12(8):955–62.

163. Moynagh PN. The interleukin-1 signalling pathway in astrocytes: a key contributor to inflammation in the brain. J Anat. 2005;207(3):265–9.

164. De Souza CT, Araujo EP, Bordin S, Ashimine R, Zollner RL, Boschero AC, et al. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. Endocrinology. 2005;146(10):4192–9.

165. Posey KA, Clegg DJ, Printz RL, Byun J, Morton GJ, Vivekanandan-Giri A, et al. Hypothalamic proinflammatory lipid accumulation, inflammation, and insulin resistance in rats fed a high-fat diet. Am J Physiol Metab. 2009;296(5):E1003–12.

166. Kälin S, Heppner FL, Bechmann I, Prinz M, Tschöp MH, Yi C-X. Hypothalamic innate immune reaction in obesity. Nat Rev Endocrinol. 2015;11(6):339–51.

167. Rocha, FR. Efeitos terapêuticos da iontoforese com nanopartículas de ouro na recuperação de lesão muscular traumática. Dissertação [Mestrado em Ciências da Saúde] - Universidade do Extremo Sul Catarinense; 2016.

168. Possato JC. Efeitos do tratamento crônico de nanopartículas de ouro na resposta inflamatória e nos parâmetros de estresse oxidativo em camundongos mdx. Dissertação [Mestrado em Ciências da Saúde] - Universidade do Extremo Sul Catarinense; 2017.

169. Wang X, Ge A, Cheng M, Guo F, Zhao M, Zhou X, et al. Increased Hypothalamic inflammation associated with the susceptibility to obesity in rats exposed to high-fat diet. Exp Diabetes Res. 2012;2012:1–8.

170. Arcidiacono B, Iiritano S, Nocera A, Possidente K, Nevolo MT, Ventura V, et al. Insulin resistance and cancer risk: an overview of the pathogenetic mechanisms. Exp Diabetes Res. 2012;2012:1–12.

171. Fischer R, Maier O. Interrelation of oxidative stress and inflammation in neurodegenerative disease: role of TNF. Oxid Med Cell Longev . 2015;2015:1–18.

172. Lassmann H. Mechanisms of neurodegeneration shared between multiple sclerosis and Alzheimer's disease. J Neural Transm. 2011;118(5):747–52.

173. Parkhurst CN, Gan W-B. Microglia dynamics and function in the CNS. Curr Opin Neurobiol. 2010;20(5):595–600.

174. BarathManiKanth S, Kalishwaralal K, Sriram M, Pandian S, Youn H, Eom S, et al. Anti-oxidant effect of gold nanoparticles restrains hyperglycemic conditions in diabetic mice. J Nanobiotechnology. 2010;8(1):16.

175. Uchiyama MK, Deda DK, Rodrigues SF de P, Drewes CC, Bolonheis SM, Kiyohara PK, et al. In vivo and in vitro toxicity and anti-inflammatory properties of gold nanoparticle bioconjugates to the vascular system. Toxicol Sci. 2014;142(2):497–507.

176. Freeman LR, Zhang L, Nair A, Dasuri K, Francis J, Fernandez-Kim S-O, et al. Obesity increases cerebrocortical reactive oxygen species and impairs brainfunction. Free Radic Biol Med. 2013;56:226–33.

177. Park HR, Park M, Choi J, Park K-Y, Chung HY, Lee J. A high-fat diet impairs neurogenesis: Involvement of lipid peroxidation and brain-derived neurotrophic factor. Neurosci Lett. 2010;482(3):235–9.

178. Yakimovich NO, Ezhevskii AA, Guseinov D V., Smirnova LA, Gracheva TA, Klychkov KS. Antioxidant properties of gold nanoparticles studied by ESR spectroscopy. Russ Chem Bull. 2008;57(3):520–3.

179. Wüllner U, Seyfried J, Groscurth P, Beinroth S, Winter S, Gleichmann M, et al. Glutathione depletion and neuronal cell death: the role of reactive oxygen intermediates and mitochondrial function. Brain Res. 1999;826(1):53–62.

180. Frohnert BI, Bernlohr DA. Protein Carbonylation, Mitochondrial Dysfunction, and Insulin Resistance. Adv Nutr. 2013;4(2):157–63.

181. Osellame LD, Blacker TS, Duchen MR. Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2012;26(6):711–23.

182. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Bioquímica. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2014. 1162 p.

183. Jheng H-F, Huang S-H, Kuo H-M, Hughes MW, Tsai Y-S. Molecular insight and pharmacological approaches targeting mitochondrial dynamics in skeletal muscle during obesity. Ann N Y Acad Sci. 2015;1350(1):82–94.

184. Yin X, Lanza IR, Swain JM, Sarr MG, Nair KS, Jensen MD. Adipocyte mitochondrial function is reduced in human obesity independent of fat cell size. J Clin Endocrinol Metab. 2014;99(2):E209-16.

185. Hüttemann M, Lee I, Pecinova A, Pecina P, Przyklenk K, Doan JW. Regulation of oxidative phosphorylation, the mitochondrial membrane potential, and their role in human disease. J Bioenerg Biomembr. 2008;40(5):445–56.

186. Thaler JP, Yi C-X, Schur EA, Guyenet SJ, Hwang BH, Dietrich MO, et al. Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. J Clin Invest. 2012;122(1):153–62.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Carta de submissão do Primeiro artigo relativo à tese

Fwd: Successfully received: submission EVALUATION OF THE TOXICITY OF GOLD NANOPARTICLES ASSOCIATED WITH SODIUM .

Assunto: Successfully received: submission EVALUATION OF THE TOXICITY OF GOLD NANOPARTICLES ASSOCIATED WITH SODIUM DICLOFENAC AND/OR SOY LECITHIN IN SWISS MICE for Materials Science & Engineering C

This message was sent automatically. Please do not reply.

Ref: MSEC_2018_2437
Title: EVALUATION OF THE TOXICITY OF GOLD NANOPARTICLES ASSOCIATED WITH SODIUM DICLOFENAC AND/OR SOY LECITHIN IN SWISS MICE
Journal: Materials Science & Engineering C

Dear Dr. Ferreira,

Thank you for submitting your manuscript for consideration for publication in Materials Science & Engineering C. Your submission was received in good order.

To track the status of your manuscript, please log into EVISE® at: http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL_ACR=MSEC and locate your submission under the header 'My Submissions with Journal' on your 'My Author Tasks' view.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Materials Science & Engineering C

Have questions or need assistance?
For further assistance, please visit our Customer Support site. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about EVISE® via interactive tutorials. You can also talk 24/5 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email.

Copyright © 2018 Elsevier B.V. | Privacy Policy

Elsevier B.V., Radarweg 29, 1043 NX Amsterdam, The Netherlands, Reg. No. 33156677.

ANEXO

ANEXO A – Paracer de Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais

UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA/UNISUL

Palhoça, 09 de novembro de 2016
Registro na CEUA (código): 16.018.4.01.IV

Ao Pesquisador/Professor(a): Gislaine Tezza Rezin

Prezado(a),

Viemos por meio deste, certificar que a proposta de estudo e/ou projeto de pesquisa intitulada "Efeitos da administração de nanopartículas de ouro isoladas ou associadas ao diclofenaco de sódio sobre parâmetros de adiposidade, inflamatórios e bioquímicos em camundongos submetidos a obesidade.", registrada com o nº16.018.4.01.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 09/11.

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
Coordenador da Comissão

Campus Florianópolis - Unidade Pedra Branca - Avenida Pedra Branca, 25 - Cidade Universitária Pedra Branca - CEP 88137-270 - Palhoça - SC - Fone 55-48-3279-1036 - ceua@unisul.br