



UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
LARISSA ESPINDOLA DA SILVA

INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO
ASSOCIADA A CARNITINA SOBRE PARÂMETROS NEUROQUÍMICOS DE
CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À OBESIDADE

Tubarão

2023

LARISSA ESPINDOLA DA SILVA

**INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO ASSOCIADA
A CARNITINA SOBRE PARÂMETROS NEUROQUÍMICOS DE
CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À OBESIDADE**

LINHA DE PESQUISA: NEUROCIÊNCIAS

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

Orientadora: Profa. Gislaíne Tezza Rezin, Dra.

Tubarão
2023



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - MESTRADO

Título da Dissertação

Investigação dos Efeitos das Nanopartículas de Ouro Associada a Carnitina sobre Parâmetros Neuroquímicos de Camundongos Submetidos à Obesidade

LARISSA ESPINDOLA DA SILVA
AUTOR

Aprovada pela Banca Avaliadora de Defesa da Dissertação em 06 de fevereiro de 2023.

Doutora Gislaine Tezza Rezin (Orientadora) *Gislaine Tezza Rezin*

Doutora Gabriela Kozuchovski Ferreira (Avaliadora externa - UNISOCIESC) - *presente por videoconferência*

Doutora Josiane Somariva Prophiro (Avaliadora interna) - *presente por videoconferência*

Daniel F. Martins.

Professor Doutor Daniel Fernandes Martins
COORDENADOR ADJUNTO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNISUL

- Unisul - Universidade do Sul de Santa Catarina, Sede, Reitoria - Av. José Acácio Moreira, 787, Bairro Dehon - 88704-900, Tubarão, SC - Fone 48 3621.3000
- Unisul Região Sul
 - Campus Tubarão - Avenida José Acácio Moreira, 787, Bairro Dehon, Caixa Postal 370 - 88704-900, Tubarão, SC - Fone 48 3621.3000
 - Campus Araranguá - Rodovia Governador Jorge Lacerda, 3201, Bairro Urussanguinha - 88905-355, Araranguá, SC - Fone 0800 970 7000 - 48 3521-3000
 - Campus Braço do Norte - Rodovia SC 370, 1023, Rio Bonito - 88750-000, Braço do Norte, SC - Fone 0800 970 7000 - 48 3621-3925
 - Campus Içara - Rua Linha Três Ribeirões, Loteamento Centenário, 250, Bairro Liri - 88820-000, Içara, SC - Fone 0800 970 7000 - 48 3621-3460
- Unisul Região Grande Florianópolis
 - Campus Pedra Branca - Avenida Pedra Branca, 25, Cidade Universitária Pedra Branca, 88137-270, Palhoça, SC - Fone 48 3279.1000
 - Campus Florianópolis - Rua DIB Mussi, 366, Centro - 88015-110, Florianópolis, SC - Fone 48 3279.1000
 - Rua Trajano, 219, Centro - 88010-010, Florianópolis, SC - Fone 48 3279.1000
- Campus Unisul Digital - Av. Pedra Branca, 25 - Cidade Universitária Pedra Branca - 88137-900, Palhoça, SC - Fone 48 3279.1200

S58 Silva, Larissa Espindola da, 1999 -
Investigação dos efeitos das nanopartículas de ouro associada a
carnitina sobre parâmetros neuroquímicos de camundongos
submetidos à obesidade / Larissa Espindola da Silva. – 2023.
50 f. : il. color.; 30 cm

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Sul de Santa Catarina,
Pós-graduação em Ciências da Saúde.
Orientação: Prof^ª. Dr^ª. Gislaine Tezza Rezin

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

CDD (21. ed.) 616.398

Ficha catalográfica elaborada por Carolini da Rocha CRB 14/1215

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pela dádiva da vida e por ter me conduzido nessa jornada.

Agradeço também aos meus pais Lauri e Ivorli, por todo apoio dado nessa caminhada, sonhando esse sonho junto comigo, e por sempre me incentivarem a ir mais longe. A eles o meu amor incondicional.

Ao meu noivo Mauricio, que esteve ao meu lado nesse período de mestrado, não medindo esforços para me auxiliar no que precisasse.

A todos os meus familiares, em especial minha avó Zuleide, por todo apoio e incentivo, e ao meu avô João, que enquanto em vida, sempre incentivou meus sonhos.

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 ensinamentos repassados e, por toda contribuição nessa formação.

Aos professores e alunos da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), pela parceria na realização das análises bioquímicas.

Ao apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo benefício PROSUC /CAPES – modalidade I, que permitiu a realização desse projeto.

A toda equipe do grupo Neuroimet, sem o auxílio deles esse projeto não teria se concretizado. Em especial a Jéssica Abel que não hesitou em me auxiliar nesse projeto. E a Mariella Reinol e Mariana Pacheco, que conviveram comigo todo esse período de mestrado, fazendo com que esse processo se tornasse mais leve, sem vocês eu não conseguiria.

Finalmente, a minha orientadora Gislaine Tezza Rezin, que fez meus olhos brilharem com o mundo da pesquisa em 2019, continuando essa jornada ao meu lado até o momento. Obrigada por todo apoio, incentivo e confiança. Por todas as orientações, sugestões e dedicação neste projeto. Ser orientada por você é um privilégio, agradeço por nossos caminhos terem se cruzado, pois se cheguei até aqui, foi graças a você, sem sua ajuda nada seria possível.

A todos, que de alguma forma, auxiliaram neste projeto, minha imensa gratidão.

RESUMO

Introdução: A obesidade leva a uma inflamação no tecido adiposo que pode chegar no sistema nervoso central (SNC), levando ao estresse oxidativo e disfunção mitocondrial em estruturas cerebrais. Devido à falta de tratamentos efetivos para a obesidade, torna-se necessário a busca por novas alternativas terapêuticas. As nanopartículas de ouro (AuNPs), por servirem como carreadoras de fármacos, poderiam levar a carnitina até o tecido adiposo, para que assim atue nesse tecido, aumentando a oxidação de ácidos graxos, diminuindo a inflamação e, conseqüentemente reestabelecendo a homeostase cerebral. **Objetivo:** O objetivo desse estudo foi investigar os efeitos das AuNPs associada a carnitina sobre parâmetros neuroquímicos de camundongos submetidos à obesidade. **Métodos:** Foram utilizados 80 camundongos Swiss machos que receberam dieta normolipídica (grupo controle) ou dieta hiperlipídica (grupo obeso) por 10 semanas. Ao final da sexta semana, os grupos foram divididos para o tratamento diário com salina, AuNPs (70ug/Kg), carnitina (500mg/Kg) ou AuNPs associada a carnitina, o tratamento durou 4 semanas. O peso corporal foi acompanhado semanalmente. Ao fim da décima semana, foi realizada a eutanásia dos animais e a gordura mesentérica removida e pesada, assim como, as estruturas cerebrais isoladas para análises bioquímicas. **Resultados:** A obesidade levou a maior peso corporal, maior acúmulo de gordura mesentérica, danos oxidativos e disfunção mitocondrial no SNC, principalmente no hipocampo. O tratamento com AuNPs ou associação demonstrou ser efetivo na reversão do estresse oxidativo e na disfunção mitocondrial no hipocampo, já a carnitina isolada ou associada, demonstrou efeito mais acentuado a nível periférico, reduzindo o acúmulo de gordura mesentérica. **Conclusão:** Conclui-se que a associação de AuNPs com carnitina possa ser uma opção promissora para o tratamento da obesidade, desde que se tenha um controle dietético associado.

Descritores: Obesidade. Estresse Oxidativo. Nanopartículas de Ouro. Carnitina.

ABSTRACT

Introduction: Obesity leads to an inflammation in adipose tissue that can reach the central nervous system (CNS), leading to oxidative stress and mitochondrial dysfunction in brain structures. Due to the lack of effective treatments for this disease, it is necessary to search for new therapeutic alternatives. Gold nanoparticles (GNPs), as they serve as drug carriers, could take carnitine to the adipose tissue, so that it acts in this tissue, increasing the oxidation of fatty acids, decreasing inflammation and, consequently, reestablishing cerebral homeostasis.

Objective: The aim of this study was to investigate the effects of GNPs associated with carnitine on neurochemical parameters in mice subjected to obesity. **Methods:** Eighty male Swiss mice that received a normolipid diet (control group) or high fat diet (obese group) for 10 weeks were used. At the end of the sixth week, the groups were divided for daily treatment with saline, GNPs (70ug/Kg), carnitine (500mg/Kg) or GNPs associated with carnitine, the treatment lasted 4 weeks. Body weight was monitored weekly. At the end of the tenth week, the animals were euthanized and the mesenteric fat removed and weighed, and the brain structures isolated for biochemical analysis. **Results:** Obesity led to greater body weight, greater accumulation of mesenteric fat, oxidative damage and mitochondrial dysfunction in the CNS, mainly in the hippocampus. Treatment with GNPs or association proved to be effective in reversing oxidative stress and mitochondrial dysfunction in the hippocampus, whereas carnitine alone or associated, demonstrated a more pronounced effect at the peripheral level, reducing the accumulation of mesenteric fat. **Conclusion:** It is concluded that the association of GNPs with carnitine can be a promising option for the treatment of obesity, provided there is an associated dietary control.

Keywords: Obesity. Oxidative Stress. Gold Nanoparticles, Carnitine.

LISTAS

Lista de abreviaturas

ACIL - CoA – Acil-Coenzima A

ACETIL - CoA – Acetilcoenzima A

AGL – Ácido Graxo Livre

AgRP – Neuropeptídeo Relacionada ao Gene Agouti (do inglês, *Agout Related Neuropeptide*)

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ARC – Núcleo Arqueado (do inglês, *arcuate nuclei*)

ATP – Adenosina Trifosfato (do inglês, *Adenosine Triphosphate*)

AuNPs – Nanopartículas de ouro

BHE – Barreira Hematoencefálica (do inglês, *Blood Brain Barrier*)

CART – Transcrito Regulado por Cocaína-Anfetamina (do inglês, *Cocaine and Amphetamine Regulated Transcript*)

CAT – Catalase

COX - 2 – Ciclooxygenase-2

CPT I – Carnitina Palmitoiltransferase I

CPT II – Carnitina Palmitoiltransferase II

DA – Dopamina

DCF – 2',7' diclorofluoresceína

DCFH-DA – Diacetato de 2,7-diclorodihidrofluoresceína

DEXA – Absorciometria com raio x de dupla energia

DNA – Ácido Desoxirribonucleico (do inglês, *Deoxyribonucleic Acid*)

DTNB – Ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzóico)

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio

FADH₂ – Flavina Adenina Dinucleotídeo Reduzida

GLP-1 – Peptídeo Semelhante ao Glucagon (do inglês, *glucagon-like peptide-1*)

GPx – Glutaciona Peroxidase

GSH – Glutaciona reduzida

H₂O₂ – Peroxido de Hidrogênio

IL – Interleucina

IMC – Índice de massa corporal

MC3R – Receptor para Melanocortina 3 (do inglês, *Melanocortin-3 receptor*)

MC4R – Receptor para Melanocortina 4 (do inglês, *Melanocortin-4 receptor*)

mRNA – RNA mensageiro (do inglês, *messenger RNA*)
NADH – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NF-κB – Fator de Transcrição Nuclear Kappa B (do inglês, *factor nuclear kappa B*)
NO – Óxido nítrico
NPY – Neuropeptídeo Y
O₂^{·-} – Ânion superóxido
OH[·] – Radical Hidroxila
OMS – Organização Mundial de Saúde
ONOO – Peroxinitrito
POMC – Proopiomelanocortina
SNC – Sistema nervoso central
SOD – Superóxido Dismutase
SDH – Succinato desidrogenase
TAB – Tecido adiposo branco
TAM – Tecido adiposo marrom
TBARS – Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TLR – Receptor do tipo Toll 4
TNF-α – Fator de necrose tumoral alfa (do inglês, *Tumoral necrosis fator alpha*)
VIGITEL – Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico

Lista de quadros

Quadro 1 – Composição e valor calórico das dietas utilizadas.....	29
Quadro 2 – Variáveis de estudo.....	33

Lista de figuras

Figura 1 – Representação da inflamação do tecido adiposo na obesidade.....	15
Figura 2 – Relação entre o metabolismo energético e a geração de EROs.....	20
Figura 3 – Representação do mecanismo de ação da carnitina na mitocôndria.....	24
Figura 4 – Delineamento experimental do estudo.....	30

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1 REFERENCIAL TEÓRICO.....	12
1.1.1 Obesidade: Definição, epidemiologia e diagnóstico	12
1.1.2 Fisiopatologia de obesidade	13
1.1.3 Obesidade e Sistema Nervoso entral	16
1.1.4 Tratamento da obesidade	21
1.1.5 Nanotecnologia	21
1.1.5.1 Nanopartículas de ouro.....	22
1.1.6 Carnitina	23
2. OBJETIVOS	25
2.1 OBJETIVO GERAL.....	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
3. MÉTODOS	26
3.1 TIPO DE ESTUDO.....	26
3.2 MATERIAL E EQUIPAMENTOS.....	26
3.3 MODELO EXPERIMENTAL.....	27
3.4 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO.....	27
3.5 CONJUGAÇÃO DE CARNITINA E NANOPARTÍCULAS DE OURO.....	28
3.6 DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	28
3.7 REMOÇÃO E ARMAZENAMENTO DOS TECIDOS.....	30
3.8 PESO DA GORDURA MESENTÉRICA.....	30
3.9 ENSAIOS BIOQUÍMICOS.....	30
3.9.1 Análise da produção de oxidantes	30
3.9.2 Análise de dano oxidativo	31
3.9.3 Atividade de enzimas antioxidantes	31
3.9.4 Metabolismo energético	32
3.9.4.1 Atividade da enzima succinato desidrogenase.....	32
3.9.4.2 Atividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial.....	32
3.10 VARIÁVEIS DE ESTUDO.....	33
3.11 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS.....	34
3.12 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA.....	34
4. ARTIGO	36

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	39
REFERÊNCIAS	40
ANEXO A - Parecer Aprovação Comitê de Ética	49

1. INTRODUÇÃO

A obesidade é considerada uma doença crônica, sendo definida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como um acúmulo anormal ou excessivo de gordura, que apresenta risco à saúde¹. Sabe-se que a obesidade tem causa multifatorial, porém seus principais fatores desencadeantes são o alto consumo calórico associado ao baixo gasto energético^{1,2}. O excedente calórico é armazenado no tecido adiposo, aumentando o acúmulo de gordura corporal, principalmente na região abdominal, estando associada a alterações em parâmetros bioquímicos, como no perfil glicídico e lipídico^{3,4}, corroborando com o desenvolvimento de comorbidades, tornando-se um grande problema de saúde pública⁵.

Na expansão do tecido adiposo através da ingestão excessiva de nutrientes, há o que se chama de hipertrofia, aumento no volume dos adipócitos, e, hiperplasia, aumento no número de adipócitos⁶, levando ao estado de hipóxia⁷. A hipóxia, leva ao recrutamento e infiltração de macrófagos M1 para o tecido, estes responsáveis pelo aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina (IL) -1 β , IL-6, e, de espécies reativas de oxigênio (EROs), levando a um estado pró-inflamatório^{8,9}.

A inflamação, por sua vez, pode chegar a nível cerebral, já que a região hipotalâmica não é totalmente protegida pela barreira hematoencefálica (BHE), fazendo com que, os ácidos graxos livres (AGL) e as citocinas pró-inflamatórias gerem uma neuroinflamação no local¹⁰. Com isso, há uma desregulação no controle alimentar e na saciedade¹¹, bem como, um desequilíbrio no sistema de recompensa¹², aliado ao estresse oxidativo¹³. O estresse oxidativo pode gerar danos a nível mitocondrial, danificando a integridade da mitocôndria¹⁴, bem como, a produção energética, acarretando em disfunção mitocondrial¹⁵.

Essas alterações presentes na obesidade necessitam de tratamento específico, pois muitas vezes, o tratamento dietético isoladamente, nem sempre é eficaz¹⁶. Por esse motivo, comumente associa-se opções farmacológicas adjuntas ao tratamento. No entanto, os atuais tratamentos farmacológicos para obesidade, visam apenas a perda de peso, não possuindo por objetivo minimizar os danos cerebrais causados pela doença, além de serem conhecidos por causar diversos efeitos colaterais aos pacientes¹⁷. Sendo assim, faz-se necessário a implementação de novas opções terapêuticas, que visem não só a perda de peso, mas o reestabelecimento da homeostase metabólica.

Dessa forma, a nanotecnologia demonstra ser uma área promissora para o tratamento de doenças, onde materiais com tamanhos de 1 a 100 nm são empregados para servir como ferramentas de diagnóstico de doenças, ou, para fornecer agentes terapêuticos a locais

específicos de maneira controlada¹⁸. As nanopartículas podem ser divididas em orgânicas e inorgânicas. Dentre as inorgânicas, destaca-se as nanopartículas de ouro (AuNPs), por suas propriedades ópticas, eletrônicas, redox e catalíticas, bem como, antioxidantes e anti-inflamatórias¹⁹. Ademais, as AuNPs possuem a capacidade carrear fármacos e biomoléculas a tecidos e células alvo, conjugando-se facilmente a oligonucleotídeos, proteínas e peptídeos²⁰.

A carnitina, por ser um dipeptídeo possui alto potencial de ligação com AuNPs. E, sua principal função é o transporte de ácidos graxos de cadeia longa do citosol para a matriz mitocondrial, onde ocorre a β -oxidação²¹. Além disso, a carnitina pode atuar como um composto antioxidante e anti-inflamatório^{22,23}. Desse modo, espera-se que a associação de AuNPs com carnitina, possa atuar na inflamação presente no tecido adiposo, e, por conseguinte, reestabelecer a funcionalidade cerebral.

1.1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1.1 Obesidade: Definição, epidemiologia e diagnóstico

Sendo definida pela OMS como um acúmulo anormal ou excessivo de gordura, a obesidade é considerada uma doença inflamatória crônica de baixo grau, que apresenta risco à saúde¹. Sabe-se que a obesidade tem causa multifatorial, porém seus principais fatores desencadeadores são o alto consumo calórico associado ao baixo gasto energético^{1,2}. Esse excedente calórico é armazenado na forma de triglicerídeos no tecido adiposo, aumentando o acúmulo de gordura corporal, principalmente na região abdominal, estando associado a alterações em parâmetros bioquímicos, como níveis elevados de glicose, triglicerídeos, bem como alterações nos níveis de colesterol e suas frações^{3,4}. Nesse sentido, a obesidade está relacionada ao desenvolvimento de comorbidades, como diabetes tipo 2²⁴ e doenças cardiovasculares²⁵. Além disso, associa-se também a doenças respiratórias²⁶, depressão²⁷ e alguns tipos de cânceres⁵.

A obesidade tornou-se um problema de saúde pública mundial, apresentando aumento dos casos em países desenvolvidos e em desenvolvimento. Dados da OMS indicam que, em 2016 mais de 1,9 bilhão de adultos apresentavam excesso de peso, sendo destes 650 milhões com obesidade, perfazendo um total de 39% de adultos acima do peso e 13% com obesidade. Ainda a nível mundial, em 2019, 38 milhões de crianças de até 5 anos foram classificadas com sobrepeso ou obesidade¹. Desse modo, estima-se que, em 2025, cerca de 2,3 bilhões de adultos

terão sobrepeso, 700 milhões terão obesidade e 75 milhões de crianças estarão com excesso de peso ou com alguma classificação de obesidade²⁸.

No Brasil, segundo a Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (VIGITEL), constatou-se que, em 2019, a frequência de excesso de peso em adultos foi 55,4%, já a frequência de obesidade foi de 20,3%, podendo perceber o aumento de 72% nos últimos treze anos, onde em 2006 esse número era de 11,8%²⁹. Com relação à obesidade infantil, o Ministério da Saúde e a Organização Panamericana da Saúde apontam que, 12,9% das crianças brasileiras entre 5 e 9 anos de idade têm obesidade, assim como 7% dos adolescentes de 12 a 17 anos¹⁷.

De acordo com os dados expostos, pode-se perceber o aumento de casos de obesidade, portanto, para um tratamento eficiente, é necessário que haja um diagnóstico correto do paciente. Nesse sentido, os métodos mais precisos são a ressonância magnética, a tomografia computadorizada, a pesagem hidrostática e a absorciometria com raio x de dupla energia (DEXA)¹⁷. No entanto, essas técnicas apresentam alto custo, dificultando sua utilização. Então, o método mais empregado e de mais fácil acesso é o cálculo do índice de massa corporal (IMC), onde divide-se o peso pela altura ao quadrado e com o resultado classifica-se o estado nutricional segundo a OMS. Nessa classificação, entende-se como sobrepeso o IMC de 25 kg/m² a 29,9 kg/m² e obesidade o IMC igual ou superior a 30 kg/m². Ainda é possível classificar de acordo com o grau de obesidade sendo de 30 a 34,0 kg/m² obesidade grau I, 35 a 39,9 kg/m² obesidade grau II e igual ou acima de 40 kg/m² obesidade grau III^{17,30}.

Apesar de muito válido e utilizado, o IMC é um método que não distingue massa gorda de massa magra, sendo assim, não é totalmente preciso^{17,30}. Por isso, é interessante associar o IMC a outros parâmetros, como a medida da circunferência abdominal, onde considera-se 102cm para homens e 88cm para mulheres como fatores de alto risco para o desenvolvimento de doenças³¹. Além desses, outros métodos de avaliação corporal também podem ser empregados, como as medidas das pregas cutâneas e a avaliação por bioimpedância, que mensura o percentual de gordura através da passagem de uma corrente elétrica pelo corpo do indivíduo. Esse método também diferencia a gordura abdominal/visceral da subcutânea, sendo essas, consideradas importantes parâmetros, visto que a distribuição anormal de gordura, principalmente o excesso de gordura visceral, é fator de risco para obesidade e suas comorbidades, o que acaba implicando na sua fisiopatologia³².

1.1.2 Fisiopatologia da Obesidade

Após a identificação da obesidade, é necessário compreender os mecanismos fisiopatológicos dessa doença. Sabe-se que o tecido adiposo pode ser distribuído por todo corpo, distinguindo-se em dois tipos, o tecido adiposo marrom (TAM) e o tecido adiposo branco (TAB). O TAM é encontrado em sua maior parte em bebês, estando em menor quantidade em adultos, sua principal função é dissipar a energia através da produção de calor (termogênese), além de ser um tecido rico em mitocôndrias. Já o TAB, é responsável por armazenar o excesso de energia na forma de triglicerídeos, liberando-os em forma de ácidos graxos quando o corpo necessita de energia³³.

Contudo, além de armazenar gordura, o TAB é considerado um órgão endócrino, que controla processos metabólicos, incluindo a homeostase de lipídios e glicose³⁴. Tendo a capacidade de secretar substâncias denominadas adipocinas, que são peptídeos com função hormonal, relacionadas ao controle da ingestão nutricional, controle da sensibilidade à insulina, bem como mediadores do processo inflamatório³⁵. Uma dessas adipocinas liberadas por este tecido é a adiponectina, que possui ação sensibilizadora da insulina, anti-inflamatória e angiogênica, porém na obesidade há uma queda na sua produção³⁶.

Outra adipocina produzida pelo tecido adiposo é a leptina, que possui papel em sinalizar a suficiência energética, ou seja, indicar saciedade³⁷. Indivíduos com obesidade apresentam níveis circulantes altos de leptina, mas esses níveis não induzem a resposta de diminuição da ingestão alimentar, mostrando então, que esses indivíduos apresentam resistência a ação da leptina³⁸. Opostamente a ação da leptina, tem-se a grelina, que é secretada pelo estômago em momentos de jejum, gerando a sensação de fome e induzindo a ingestão de alimentos. Níveis elevados de grelina são observados em pacientes com obesidade³⁹.

Intimamente ligada a homeostase da glicemia tem-se a insulina, juntamente com a adiponectina, a resistina e a visfatina⁴⁰. De fato, a insulina é um hormônio relacionado ao metabolismo energético, sendo secretada pelas células beta pancreáticas, tendo função de sinalizar a entrada de glicose nas células⁴¹. Indivíduos com obesidade comumente apresentam resistência a ação da insulina. Isso se deve ao fato do acúmulo de AGL, bem como, da inflamação presente na obesidade, comprometerem a captura da glicose para dentro da célula⁴². 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 assim, os níveis circulantes deste hormônio⁴¹.

O presente desequilíbrio hormonal na obesidade favorece o consumo excessivo de nutrientes, com isso há uma expansão do tecido adiposo, resultando em hipertrofia dos adipócitos, aumentando a sua capacidade de armazenamento de lipídeos. Quando a capacidade

de armazenamento é saturada, há uma replicação adipocitária, originando adipócitos adicionais em um processo designado hiperplasia⁶. Com isso, há um estreitamento no espaço extracelular, comprimindo os vasos sanguíneos e, conseqüentemente, levando ao comprometimento da irrigação sanguínea e da distribuição de oxigênio no local, favorecendo o estado de hipóxia⁷.

A hipóxia, por sua vez, leva a necrose adipocitária, com conseqüente liberação excessiva de quimiocinas, como a proteína quimiotática de monócitos-1, levando ao recrutamento e infiltração de monócitos da corrente sanguínea para o tecido, dando origem a macrófagos teciduais. Os macrófagos recrutados, sofrem uma mudança na distribuição, formando estruturas semelhantes a coroas ao redor dos adipócitos necróticos⁴³. Esses macrófagos expressam fenótipo M1, ou seja, apresentam perfil pró-inflamatório, sendo estes, responsáveis pelo aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL -1 β e IL-6 e de EROs, levando a um estado pró-inflamatório^{8,9} (Figura 1).

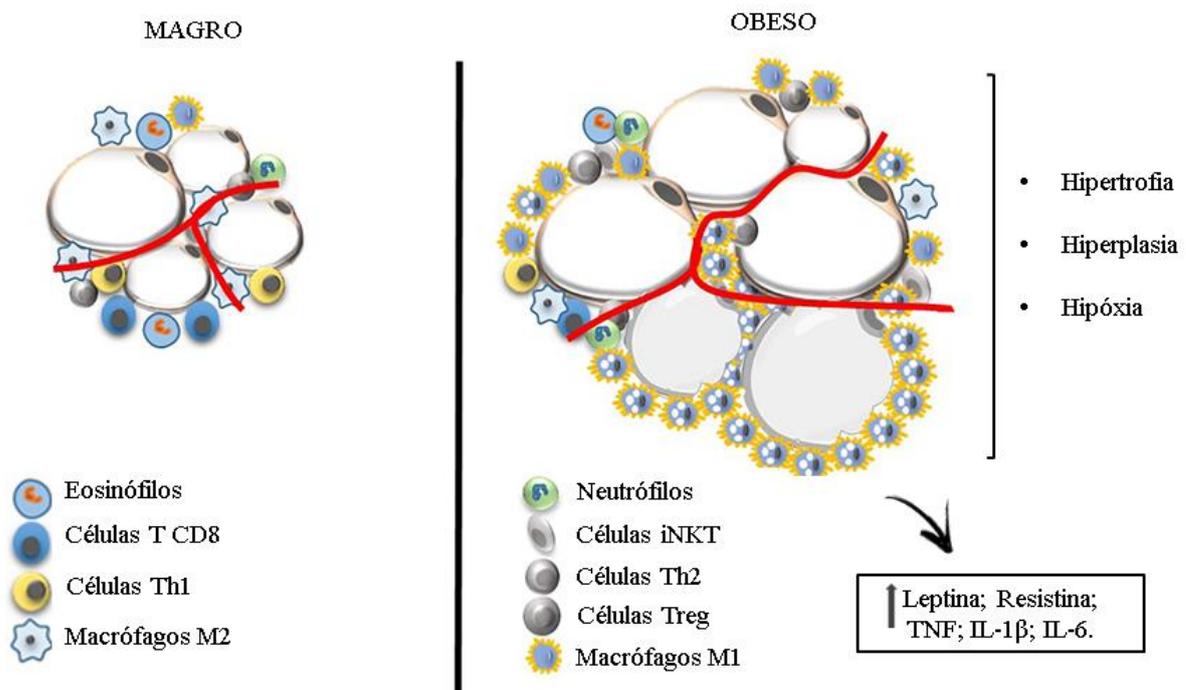


Figura 1: Representação da inflamação do tecido adiposo na obesidade.

Diferença no tamanho e no número dos adipócitos entre indivíduos magros e indivíduos com obesidade. Na obesidade observa-se hipóxia com conseqüente quadro inflamatório. IL-1 β : interleucina - 1 β ; IL-6: interleucina - 6; iNKT: células T natural killer invariáveis; T CD8: linfócitos T do agrupamento de diferenciação 8; Th1: T helper 1; Th2: T helper 2; TNF: fator de necrose tumoral; Treg: células T reguladoras.

Fonte: Adaptado de Ahmed et al⁴²

Por isso, a obesidade é reconhecida como uma doença que leva a uma inflamação crônica de baixo grau, com aumento AGL circulantes e citocinas pró-inflamatórias, resultando

em uma alteração da homeostase de muitos órgãos, inclusive no sistema nervoso central (SNC), podendo ser afetado pela via do nervo vago, pelo plexo córoide ou através da BHE, gerando uma neuroinflamação^{10,44}.

1.1.3 Obesidade e Sistema Nervoso Central

A função cerebral pode ser afetada pelo alto consumo de dietas ricas em calorias e gordura saturada, pois modificam a microbiota intestinal, aumentando a inflamação e a permeabilidade do intestino, impactando na comunicação intestino-cérebro através do nervo vago⁴⁵. Além disso, AGL circulantes, bem como, citocinas pró-inflamatórias, podem afetar a função cerebral⁴⁶. De fato, os AGL podem ativar os receptores do tipo Toll 4 (TLR4), que estão localizados na membrana superficial das células imunes inatas, aumentando a inflamação mediada pelo fator nuclear kappa B (NF- κ B). Por conseguinte, há o aumento do extravasamento de leucócitos, liberação de citocinas pró-inflamatórias e ativação da micróglia⁴⁷. Ademais, a ativação da via do NF- κ B, está relacionada à inibição dos hormônios anoréxicos insulina e leptina no hipotálamo, levando à insensibilidade a ação desses hormônios⁴⁸.

A BHE é uma membrada composta por células endoteliais intimamente justapostas, que ficam alinhadas com os capilares, envolvendo todo o SNC, que atua impedindo ou dificultando a passagem de substâncias do sangue para o tecido nervoso⁴⁹. No entanto, a BHE não protege a eminência mediana, e, sabe-se que o hipotálamo detecta nutrientes e hormônios circulantes por meio dessa região, que contém um sistema capilar único, e, integra os sinais de saciedade e estado nutricional para manter a homeostase metabólica, via sinalização neuroendócrina e autonômica. Portanto, o hipotálamo acaba não sendo totalmente protegido pela BHE, sendo esse fator contribuinte para que essa estrutura fique suscetível a fatores circulantes, como AGL e citocinas pró-inflamatórias, gerando neuroinflamação⁵⁰.

O hipotálamo controla uma série de funções neuroendócrinas que regulam a homeostase energética, estando diretamente relacionado com a ingestão de alimentos¹⁰. Dessa forma, detecta e integra o *feedback* hormonal, que circulam em níveis proporcionais ao estado nutricional e às reservas do tecido adiposo¹¹. Para essa função, o hipotálamo possui um sistema de melanocortina, que consiste em duas populações neuronais funcionalmente antagônicas, que estão localizadas no núcleo arqueado (ARC) do hipotálamo mediobasal. As projeções do ARC atingem os núcleos paraventriculares que contêm altos níveis do receptor para melanocortina 3 (MC3R) e do receptor para melanocortina 4 (MC4R). Os subconjuntos de neurônios que atuam no ARC são os neurônios orexígenos, que contêm o neuropeptídeo Y (NPY) e o neuropeptídeo

relacionado ao gene *agouti* (AgRP), e os neurônios anorexígenos, onde fazem parte a proopiomelanocortina (POMC) e o transcrito regulado por cocaína-anfetamina (CART). Ambas as populações neuronais expressam altos níveis de receptores que ligam hormônios e, respondem a estímulos metabólicos para controlar a ingestão de alimentos e o gasto energético⁵¹.

No estado alimentado, foi demonstrado em modelo experimental, que há um aumento nos níveis circulantes de insulina e leptina, esses inibem os neurônios AgRP e ativam os neurônios POMC, o que desencadeia a sinalização de MC4R, levando à diminuição da ingestão energética e ao aumento do gasto energético, culminando em saciedade⁵². Em contrapartida, no jejum, há um aumento nos níveis circulantes de grelina, ativando os neurônios do AgRP, enquanto inibe a expressão de POMC, resultando em diminuição da sinalização de MC4R, ocasionando a estimulação do comportamento alimentar⁵³. Por esses motivos, o hipotálamo é conhecido como o centro da saciedade.

Embora o controle alimentar homeostático, realizado pelo hipotálamo, tenha grande influência no controle da ingestão de alimentos, ele não é o único. Dessa forma, o hipotálamo também exerce efeito sobre a regulação através da via hedônica, baseada no sistema de recompensa, que consiste principalmente em projeções dopaminérgicas, essas da área tegmental ventral e da substância nigra, para o córtex pré-frontal, o estriado e o núcleo accumbens⁵⁴. Assim, o hipotálamo recebe sinais externos e se comunica diretamente com componentes do sistema de recompensa, ou seja, à medida que indivíduos com obesidade consomem alimentos em níveis acima da manutenção homeostática, o sistema de recompensa pode exercer mais controle sobre o impulso de comer⁵⁵. Portanto, os circuitos homeostáticos e de recompensa atuam em conjunto para promover comportamentos alimentares em condições de privação e inibir a ingestão de alimentos em condições de saciedade⁵⁶.

Diante disso, certos alimentos, particularmente os hiperpalatáveis, ou seja, os ricos em açúcares e gorduras, geram recompensas que promovem a alimentação, mesmo na ausência da necessidade energética⁵⁷. Isso se dá, por meio da liberação de dopamina (DA), que é um neurotransmissor chave na modulação de recompensas naturais e medicamentosas⁵⁶. Desse modo, após a primeira exposição a uma recompensa alimentar (alimento hiperpalatável), há um disparo de DA da área tegmental ventral para o núcleo accumbens⁵⁸. No entanto, com a exposição repetida à esse alimento, a resposta dopaminérgica se habitua e, é gradualmente transferida para os estímulos associados, como o cheiro da comida, que é então processado como um preditor, tornando-se uma sugestão condicionada à essa recompensa⁵⁹.

A exposição a esses estímulos alimentares está diretamente relacionada ao desejo de comer. Assim, um indivíduo constantemente comerá um determinado alimento para experimentar esse sentimento prazeroso de recompensa, podendo levar a obesidade⁵⁹. De fato, é visto que na obesidade há um comprometimento do sistema de recompensa, destacando anormalidades em regiões como córtex pré-frontal e estriado¹². Aliado a isso, é visto que indivíduos com obesidade tem uma menor disponibilidade de receptores D2 para DA no corpo estriado⁶⁰. A diminuição da sinalização dos receptores D2, provavelmente reduz a sensibilidade às recompensas naturais, um déficit que os indivíduos com obesidade podem se esforçar para compensar temporariamente comendo além do necessário⁶¹.

Outra estrutura cerebral que também está intimamente relacionada a obesidade, é o hipocampo. Esse, está associado a regulação do humor, aprendizado e memória, bem como, está envolvido na regulação dos comportamentos alimentares por meio do processamento de processos mnemônicos⁶². Realmente, estudos sugerem possíveis efeitos da dieta obesogênica em prejudicar a plasticidade neural no hipocampo, o que, por sua vez, poderia contribuir para o declínio cognitivo, distúrbios emocionais, e, em comportamentos de hiperfagia^{63,64}. Aliado a isso, estudo de imagem demonstra que, em indivíduos com obesidade, mas não em indivíduos eutróficos, o hipocampo mostra hiperativação em resposta a estímulos alimentares⁶⁵. Em suma, a plasticidade sináptica hipocampal prejudicada, pode agravar quadros de obesidade⁶⁶.

Na obesidade, o excesso de nutrientes ingeridos, bem como, a sinalização de citocinas pro-inflamatórias, levam à formação de EROs, por meio de diversas vias intracelulares. Do mesmo modo, a maior produção de EROs, intensifica o processo inflamatório, tornando-se então, um ciclo vicioso⁶⁷. Dentre as EROs tem-se o radical ânion superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^\cdot). As EROs podem reagir com outras moléculas e causar danos a lipídios, proteínas e ao ácido desoxirribonucleico (DNA)⁶⁸. Para combater as EROs, o organismo dispõe de um sistema antioxidante, que tem por objetivo limitar os níveis dessas espécies. Esse sistema se baseia em antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. Dentre o enzimático, tem-se as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx). Já o não enzimático é composto por vitamina E, vitamina C, ácido úrico, carotenóides e polifenóis, sendo esses de origem dietética⁶⁹. Quando há um desequilíbrio na produção desses oxidantes e redução das defesas antioxidantes, acontece o que se chama de estresse oxidativo⁷⁰.

O estresse oxidativo está presente na obesidade, onde estudo demonstrou que uma dieta rica em gordura induz estresse oxidativo a nível cerebral, bem como disfunção do mesmo¹³. Ainda, o excesso de EROs pode levar à disfunção mitocondrial⁷¹. Do mesmo modo, a disfunção

mitocondrial, presente na obesidade, pode favorecer a geração de EROs⁷². Isso se deve ao fato do consumo excessivo de nutrientes acarretar em sobrecarga mitocondrial de ácidos graxos e glicose, elevando a produção de acetilcoenzima A (Acetil-CoA), bem como de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) pelo ciclo de Krebs, aumentando a disponibilidade de elétrons⁷³. Quando a taxa de entrada de elétrons na cadeia respiratória e, a taxa de transferência de elétrons ao longo da cadeia não são coordenadas, há o vazamento de elétrons, principalmente dos complexos I e III⁷⁴. Em sequência, esses elétrons reagem com o oxigênio, formando o O_2^- , que é reduzido a H_2O_2 pela enzima SOD. Ademais, o O_2^- pode reagir com o radical livre óxido nítrico (NO) e gerar a espécie reativa de nitrogênio, peroxinitrito (ONOO)⁷⁵. O ONOO pode oxidar moléculas biológicas, incluindo lipídios, DNA e proteínas por meio de reações diretas ou por hemólise espontânea⁷⁶.

Por conseguinte, na presença de ferro o H_2O_2 forma OH^- pela reação de Fenton, para que isso não ocorra, é necessário que o H_2O_2 seja reduzido a água, essa reação é realizada pelas enzimas CAT e GPx⁷⁷. A GPx tem como substrato a glutathiona reduzida (GSH), que também atua na desintoxicação de aldeídos reativos, como o malondialdeído sendo esses, gerados durante a peroxidação lipídica⁷⁸. Portanto, a maior produção de EROs pode levar a danos celulares, agredindo os complexos da cadeia respiratória mitocondrial, prejudicando sua funcionalidade⁷⁹. De fato, as mitocôndrias exercem papel fundamental no metabolismo energético. Tendo como principal função a produção de energia para as células a partir de substratos provenientes da alimentação, resultando na formação de adenosina trifosfato (ATP)⁸⁰.

Assim, os elétrons provenientes dos nutrientes, são transformados em acetil-CoA, que é transferido ao ciclo de Krebs⁷⁴. Esse ciclo é formado por uma série de reações compostas por oito passos. Assim, a primeira etapa do ciclo, é realizada pela enzima citrato sintase que catalisa a condensação do oxaloacetato e do grupo acetil da Acetil-CoA, formando citrato¹⁴. Em seguida, ocorre a isomerização do citrato, sendo convertido a isocitrato, pela ação da enzima aconitase⁸¹. O isocitrato é então, descarboxilado em alfa-cetoglutarato pela enzima isocitrato desidrogenase. Posteriormente, ocorre uma segunda descarboxilação, onde o alfa-cetoglutarato é convertido em succinil-CoA pelo complexo alfa-cetoglutarato desidrogenase. O succinil-CoA, sofre ação da succinil-CoA sintetase, formando succinato. O succinato, é oxidado a fumarato pela succinato desidrogenase (SDH), que é transformado a malato pela fumarase. Por fim, o malato é oxidado para formar oxaloacetato, a partir da ação da malato desidrogenase^{82,83}. Dessa forma, todas as enzimas que compõem o ciclo de Krebs possuem papel fundamental, havendo destaque para a enzima SDH, que é um dos marcadores mais confiáveis da capacidade

mitocondrial de fornecer uma quantidade adequada de ATP, pois faz parte tanto do ciclo de Krebs quanto da cadeia respiratória mitocondrial (complexo II)⁸⁴.

Com a finalização da volta no ciclo de Krebs, há a geração de duas moléculas de CO₂, três de NADH, uma de flavina adenina dinucleotídeo reduzida (FADH₂) e uma molécula de ATP⁷⁴. O NADH e o FADH₂ transferem elétrons para o complexo I e II, respectivamente, da cadeia respiratória mitocondrial e, a partir destes, vão para os complexos III e IV. Com isso, há um bombeamento de prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas, formando um gradiente eletroquímico, responsável pela formação do potencial de membrana mitocondrial, encaminhando o fluxo de prótons de volta à matriz mitocondrial através da ATP sintase que, por fim, utiliza essa energia para a síntese de ATP^{74,85} (Figura 2).

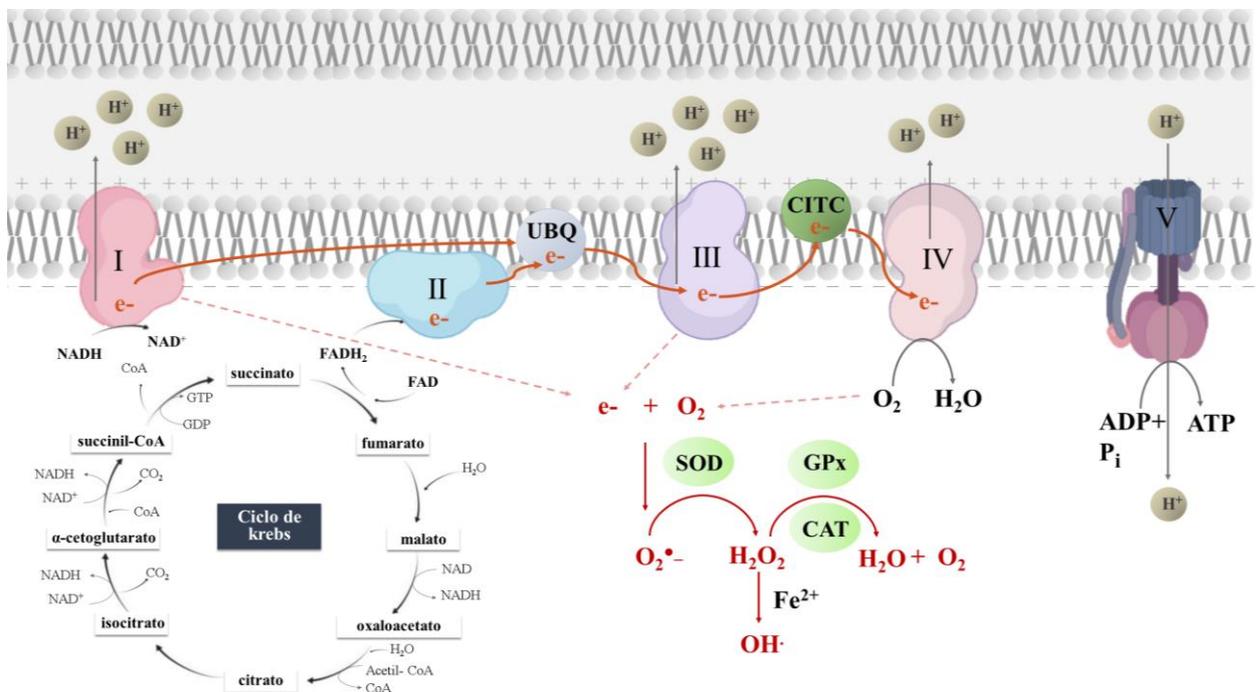


Figura 2: Relação entre o metabolismo energético e a geração de EROs.

A partir do transporte de elétrons pela cadeia respiratória mitocondrial pode haver a formação de EROs, para reduzir esses EROs tem-se a ação das enzimas antioxidantes. ADP: adenosina difosfato; ATP: adenosina trifosfato; CAT: catalase; CITC: citocromo c; CoA: coenzima A; e-: elétrons; FAD: flavina adenina dinucleotídeo; FADH₂: flavina adenina dinucleotídeo reduzida; Fe²⁺: ferro; GPx: glutationa peroxidase; H⁺: íon hidrogênio; H₂O: água; H₂O₂: peróxido de hidrogênio; NAD⁺: nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada; NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida; O₂: oxigênio; O₂^{•-}: ânion superóxido; OH•: radical hidroxila; Pi: fosfato; SOD: superóxido dismutase; UBQ: ubiquinona.

Fonte: Adaptado de Nolfi-Donagan et al ⁷⁹.

Na obesidade, o desequilíbrio metabólico da entrada de nutrientes, produção de energia e oxidação, resulta em disfunção mitocondrial⁸⁶. A disfunção mitocondrial é definida como a

incapacidade das mitocôndrias de gerar e sustentar níveis suficientes de ATP⁸⁷. Ademais, a disfunção mitocondrial também está envolvida em alguns sinais e sintomas presentes na obesidade, como o baixo gasto energético, ingestão crônica excessiva de alimentos e, a presença de marcadores inflamatórios. Essas mudanças não só favorecem o desenvolvimento e progressão da obesidade, mas também têm implicações para o seu tratamento¹⁵.

1.1.4 Tratamento da Obesidade

A obesidade é considerada uma doença multifatorial, portanto, o tratamento deve conter uma abordagem multidisciplinar¹⁷. Com isso, sabe-se que a primeira linha de tratamento deve ser a junção de uma dieta hipocalórica, isto é, que proporcione balanço energético negativo, associada com a prática regular de atividade física, aumentando assim o gasto energético, juntamente com terapia cognitiva⁸⁸.

Entretanto, o tratamento dietético e o acréscimo de atividade física, isoladamente, nem sempre é eficaz¹⁶. Por isso, comumente associa-se opções farmacológicas adjuntas ao tratamento. No Brasil, estão autorizados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) alguns fármacos para tratamento da obesidade, sendo eles a sibutramina, o orlistate e a liraglutida. Todavia, sabe-se que esses fármacos disponíveis até o momento, não trazem uma total efetividade, visto que possuem diferentes efeitos adversos a saúde¹⁷. Desse modo, há a necessidade da busca de novas alternativas terapêuticas mais seguras e efetivas para o tratamento da obesidade, principalmente visando o reestabelecimento da homeostase metabólica.

1.1.5 Nanotecnologia

Sendo considerada uma área promissora e, em crescimento, a nanotecnologia tem por objetivo a criação de estruturas, dispositivos e materiais, através de rearranjo dos átomos, de modo que essas estruturas e componentes melhorem significativamente suas propriedades¹⁸. Desse modo, é possível sua aplicação em uma ampla gama de campos, como na química, física, biologia, medicina, engenharia e eletrônica⁸⁹. O prefixo “nano” é referido ao termo grego que significa “anão” ou algo muito pequeno, e representa um milionésimo de metro⁹⁰.

A nanotecnologia contém materiais com tamanhos de 1 a 100 nm, bem como possui propriedades de reatividade química, condutância elétrica, magnetismo, efeitos ópticos e resistência física⁹¹. As nanopartículas podem ser divididas em orgânicas e inorgânicas. Dentre

as orgânicas tem-se os vírus e os componentes celulares. Já as inorgânicas, são compostas por óxidos metálicos, como o óxido de ferro, dióxido de titânio, dióxido de silício, entre outros, e, pelos metais, como o cobre, o níquel, a prata e o ouro⁹². De fato, devido ao seu tamanho, as nanopartículas podem entrar e atravessar tecidos com maior facilidade, havendo destaque para as nanopartículas metálicas, que tem por função a entrega de fármacos. Dessa maneira, as nanopartículas metálicas, podem melhorar a biodisponibilidade de fármacos potencializando os efeitos terapêuticos⁹³.

1.1.5.1 Nanopartículas de ouro

As AuNPs fazem parte do grupo de nanopartículas metálicas, possuindo facilidade em penetrar membranas celulares devido a sua escala nanométrica, por esse motivo, apresenta uma gama de finalidades em aplicações biomédicas⁹⁴. Em vista disso, o uso de AuNPs é empregado no diagnóstico e tratamento de cânceres⁹⁵, assim como, para o tratamento de processos inflamatórios e autoimunes⁹⁶. Ademais, as AuNPs são conhecidas por suas propriedades ópticas, eletrônicas, redox e catalíticas, bem como antioxidantes e anti-inflamatórias¹⁹.

Os mecanismos de ação das AuNPs nas vias inflamatórias e oxidativas, pode ser demonstrado por Khan e colaboradores⁹⁷, onde foi induzido artrite em ratos e esses foram tratados com AuNPs na dose de 20 µg/kg, por 20 dias, e a partir disso foi demonstrado uma diminuição significativa no nível de mediadores inflamatórios, como TNF- α , IL-1 β , ciclooxigenase-2 (COX-2) e de fator de transcrição nuclear kappa B (NF-kB). Além disso, as AuNPs atenuaram notavelmente o desequilíbrio no nível de antioxidante e oxidante, chegando próximo ao normal. Portanto, as AuNPs atuam como agentes antioxidantes, inibindo a cascata de formação de EROs e aumentando o sistema de defesa antioxidante enzimático⁹⁸.

Outro mecanismo proposto pela literatura sobre a ação das AuNPs nas vias inflamatórias se dá através da regulação negativa da expressão de IL-1 β . Nesse sentido, foi evidenciado a capacidade das AuNPs de interagir com IL-1 β extracelular, evitando sua ligação aos receptores de membrana, inibindo a cascata de sinalização de IL-1 β , neutralizando as propriedades inflamatórias dessa citocina⁹⁹. Aliado a isso, Chen e colaboradores¹⁰⁰ demonstraram redução nos níveis de RNA mensageiro (mRNA), de TNF- α e de IL-6 na gordura de camundongos que receberam AuNPs de 21nm, havendo também, redução de gordura retroperitoneal e mesentérica desses camundongos.

Ademais, as AuNPs também podem agir no SNC, visto que conseguem ultrapassar BHE sem a necessidade de estímulos externos^{101,102}. Em vista disso, Prá e colaboradores¹⁰³

demonstraram que o tratamento com AuNPs, de 18 nm, na concentração de 70 ug/kg uma vez ao dia, por 14 dias, foi capaz de reverter dano oxidativo cerebral, em modelo animal de obesidade, ainda nesse mesmo estudo, foi observado uma concentração significativa de AuNPs no tecido adiposo, o que pode ser útil para o tratamento da inflamação associada à obesidade. Outra característica das AuNPs é a capacidade de se conjugarem facilmente a drogas e biomoléculas, como oligonucleotídeos, proteínas e peptídeos. Portanto, as AuNPs podem ser consideradas carreadoras de fármacos, podendo utiliza-las como veículos para entrega de moléculas, como a carnitina, em tecidos e células alvo²⁰.

1.1.6 Carnitina

A carnitina, por ser um dipeptídeo possui alto potencial de ligação com AuNPs. Podendo ser obtida pela dieta a partir de produtos derivados de animais, como carne vermelha e laticínios e, também pode ser sintetizada endogenamente nos rins, fígado e cérebro¹⁰⁴. Apesar disso, é considerada um nutriente condicionalmente essencial para humanos em circunstâncias específicas, quando os níveis intracelulares são baixos, por exemplo, em bebês prematuros, pacientes idosos, diabetes tipo 2 e condições genéticas que resultam em deficiência primária ou secundária de carnitina¹⁰⁵.

A principal função da carnitina é o transporte de ácidos graxos de cadeia longa do citosol para a matriz mitocondrial, onde ocorre a β -oxidação²¹. Esse processo é realizado em três passos pelo ciclo da carnitina. Inicialmente, o ácido graxo de cadeia longa é convertido em Acil-coenzima A (acil-CoA) graxo pela enzima acil-CoA sintase. Em seguida, o acil-CoA graxo, é convertido em acilcarnitinas, pela ação da enzima carnitina palmitoiltransferase I (CPT I) localizada na membrana mitocondrial externa. As acilcarnitinas atravessam a membrana mitocondrial interna através de um transportador acil-carnitina/carnitina, em troca de carnitina livre. Por fim, a enzima carnitina palmitoiltransferase II (CPT II), localizada na membrana mitocondrial interna, converte as acilcarnitinas de volta em acil-CoA graxo, para ser usado na β -oxidação. Juntamente é liberado a carnitina livre, dentro da matriz mitocondrial. A carnitina retorna ao espaço intermembrana por meio do transportador acil-carnitina/carnitina, servindo como substrato para CPT I para formar mais acilcarnitina⁷⁴ (Figura 3).

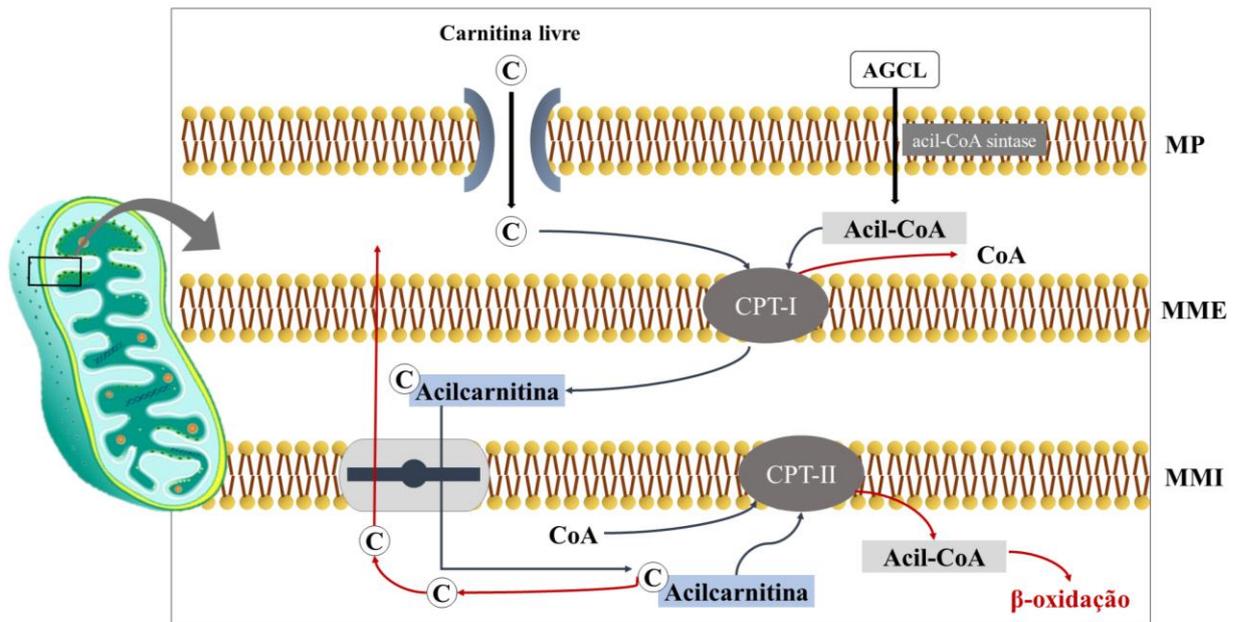


Figura 3: Representação do mecanismo de ação da carnitina na mitocôndria.

A carnitina é necessária para o transporte de ácidos graxos de cadeia longa para dentro da mitocôndria, esse processo é realizado em três passos pelo ciclo da carnitina, que envolve várias enzimas presentes na membrana mitocondrial, tendo como objetivo final, a produção de energia a partir de ácidos graxos. AGCL: ácido graxo de cadeia longa; CoA: coenzima A; C: carnitina livre; CPT-I: carnitina palmitoiltransferase I; CPT-II: carnitina palmitoiltransferase II; MP: membrana plasmática; MME: membrana mitocondrial externa; MMI: membrana mitocondrial interna.

Fonte: Adaptado de Takahashi¹⁰⁶.

De fato, o transporte da carnitina é essencial para evitar o acúmulo de ácidos graxos de cadeia longa e acil-CoAs de cadeia longa, que podem ser deletérios para as células¹⁰⁵. No entanto, a carnitina possui outras funções, onde estudos *in vivo* demonstraram ação antioxidante, impedindo a disfunção mitocondrial¹⁰⁷ e, anti-inflamatória²³, bem como, melhora no metabolismo da glicose¹⁰⁸ e efeito cardioprotetor¹⁰⁹. Estudos em humanos também demonstraram esses efeitos, apresentando ação cardioprotetora¹¹⁰, antioxidante¹¹¹, anti-inflamatória¹¹² e, efeito no desenvolvimento embrionário¹¹³. Portanto, a carnitina, por ser um dipeptídeo possui alto potencial de ligação com AuNPs, com isso, poderá ser carregada com mais facilidade para a gordura visceral, atuando na inflamação presente nesse tecido, e, conseqüentemente, reestabelecendo a funcionalidade cerebral.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos das AuNPs associada a carnitina sobre parâmetros neuroquímicos de camundongos submetidos à obesidade.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito do tratamento com AuNPs associada a carnitina sobre o peso corporal e o peso da gordura mesentérica de camundongos submetidos à obesidade induzida por dieta hiperlipídica;
- Avaliar a produção de oxidantes e os níveis de dano oxidativo em cérebro de camundongos submetidos a obesidade tratados com AuNPs associada a carnitina;
- Avaliar a atividade da SOD e os níveis de GSH em cérebro de camundongos submetidos a obesidade tratados com AuNPs associada a carnitina;
- Avaliar a atividade da enzima SDH em cérebro de camundongos submetidos a obesidade tratados com AuNPs associada a carnitina;
- Avaliar a atividade dos complexos I, II e IV da cadeia respiratória mitocondrial em cérebro de camundongos submetidos a obesidade tratados com AuNPs associada a carnitina.

3. MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDO

O presente trabalho trata-se de um estudo experimental com modelo animal de obesidade induzida pelo consumo de dieta hiperlipídica e tratamento com AuNPs associada a carnitina.

3.2 MATERIAL E EQUIPAMENTOS

As rações foram obtidas da empresa PragSoluções Biociências – PragSoluções Comércio e Serviços Ltda, SP, Brasil. As AuNPs foram produzidas a partir do ácido tetracloroáurico adquirido na Sigma-Aldrich, MO, EUA, juntamente com o agente redutor citrato de sódio (Nuclear, SP, Brasil). A carnitina foi comprada na farmácia de manipulação Maria Rocha, SC, Brasil.

Para dosagem dos níveis de DCF, foi utilizado: Diacetato do DCF. Para análise de dano oxidativo em lipídios foi utilizado: ácido tricloroacético e ácido tiobarbitúrico. A análise de dano a proteínas foi realizada com o uso de ácido tricloroacético e dinitrofenilhidrazina. Para avaliar a atividade da SOD, foi utilizado: glicina-NaOH e adrenalina 60 mM. Para análise nos níveis de GSH, foi utilizado: ácido tricloroacético 10%, tampão fosfato e ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzóico) (DTNB).

Para determinação de quantidade proteica na amostra, foi utilizado: Albumina bovina, hidróxido de sódio, carbonato de sódio, sulfato de cobre, tartarato de Na⁺ e K⁺ e Folin. Para análise da enzima SDH foi utilizado: Fosfato de potássio dibásico, fosfato de potássio monobásico, rotenona, succinato de sódio, 2,6-dicloroindofenol (2,6-DCIP), azida sódica e metassulfato de fenazina. Para análise da atividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial, foi utilizado: Fosfato de potássio dibásico, fosfato de potássio monobásico, rotenona, ferricianeto, NADH, succinato de sódio, 2,6-DCIP e azida sódica, lauril maltosídeo, tampão SETH (Sacarose, EDTA, Trizma base e Heparina), borato e CitocromoC.

Os equipamentos utilizados para síntese e caracterização das AuNPs foram: balão de fundo redondo, agitador magnético, espectrofotômetro modelo UV-1800 e NanoBrook Omni (Brookhaven Instruments Corporation NY, EUA), e foram feitas em parceria com o laboratório do Laboratório de Fisiopatologia Experimental na Universidade do Extremo sul Catarinense

(UNESC). Para as análises bioquímicas foi utilizado: Homogeneizador, freezer, geladeira, balança analítica, pHmetro, centrífuga, banho-maria, espectrofotômetro. O experimento acontecerá no biotério e Laboratório de Neurobiologia de Processos Inflamatórios e Metabólicos, UNISUL, Tubarão/SC.

3.3 MODELO EXPERIMENTAL

Foram utilizados 80 camundongos machos da linhagem Swiss (espécie *Mus musculus*) com 40 dias de vida, pesando em torno de 30 a 40g. Tal amostra, foi calculada com base em estudos prévios utilizando modelos animais, para uma diferença de até 20% nos parâmetros a serem analisados entre os grupos, com uma variância de no máximo 10% entre as médias, considerando um erro alfa de 0,05 e poder de 80%, calculou-se o n amostral de 10 por grupo. Os animais foram armazenados em gaiolas forradas com maravalha, com lotação máxima de 5 camundongos, sendo mantidos em ciclos de claro-escuro de 12 horas e temperatura de $23\pm 1^{\circ}\text{C}$. Onde tiveram livre acesso à água e ração. Os animais foram procedentes do biotério da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

3.4 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO

AuNPs com tamanhos médios de 20 nm foram sintetizadas, a partir de redução química do precursor metálico ácido tetracloroáurico (HAuCl_4) (Sigma-Aldrich, MO, EUA) com o agente redutor e estabilizante citrato de sódio (Nuclear, SP, Brasil). Inicialmente, 100 mL de ácido tetracloroáurico, foi transferido para um balão de fundo redondo, a solução aquecida até 95°C e sob agitação. A solução de citrato de sódio, previamente preparada, foi então adicionada, e o sistema foi mantido à temperatura descrita, agitando durante 20 minutos¹¹⁴. A solução adquiriu a coloração correspondente ao tamanho.

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

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

3.5 CONJUGAÇÃO DE CARNITINA E NANOPARTÍCULA DE OURO

A conjugação das AuNPs com carnitina foi realizado adicionando a carnitina na AuNPs, essa mistura ficou em agitação por 1 hora em temperatura ambiente, para que ocorresse a reação. A concentração de carnitina foi de 500mg/ml em AuNPs, a qual foi a concentração mínima testada previamente capaz de ligar a nanopartícula¹¹⁵.

3.6 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Inicialmente os animais foram pesados e divididos em dois grupos: grupo controle (n=40), que recebeu dieta normolipídica e, grupo obeso (n=40) que recebeu dieta hiperlipídica. Em seguida, deu-se início ao protocolo de indução do modelo animal de obesidade, que teve duração de 10 semanas através do consumo de ração hiperlipídica, que oferece um maior teor de calorias e de gordura saturada, quando comparada a ração normolipídica, como demonstrado quadro 1. O protocolo para indução da obesidade, bem como, a composição das dietas foi baseado em estudos prévios¹¹⁶. Desse modo, para confirmação do modelo animal de obesidade, foi verificado o consumo alimentar a cada 48 horas e, calculado por meio da diferença entre a ração ofertada e as sobras. A avaliação do consumo alimentar é importante para acompanhar a aceitação da dieta, detectar alterações e influências ambientais, e acompanhar a relação com a evolução do peso corporal. O peso corporal foi mensurado semanalmente, durante todo o experimento.

Quadro 01 – Composição e valor calórico das dietas utilizadas.

COMPONENTES	Dieta normolípida		Dieta Hiperlipídica	
	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	0	-	312	2808
Celulose	50	-	50	-
Mistura de minerais	35	-	35	-
Mistura de vitaminas	10	-	10	-
L Cistina	3	-	3	-
Bitartarato de colina	2,5	-	2,5	-
Butil hidroxitolueno	0,028	-	0,028	-
Total	1000,03	3.798	1000,03	5.358

Fonte: Adaptado de Cintra et al¹¹⁷ e Razolli et al¹¹⁸.

Ao final da sexta semana deu-se início do tratamento com AuNPs associado a carnitina. Nesse sentido, os animais foram novamente divididos, nos seguintes grupos: Grupo controle + salina, Grupo controle + AuNPs, Grupo controle + carnitina, Grupo controle + AuNPs + carnitina, Grupo obeso + salina; Grupo obeso + AuNPs, Grupo obeso + carnitina, Grupo obeso + AuNPs + carnitina, ambos os grupos com um n=10 cada. Assim, os grupos receberam, via intraperitoneal, uma vez ao dia, o tratamento com nas seguintes concentrações: Grupos AuNPs receberam 70ug/kg¹⁰³ de AuNPs (20nm), Grupos carnitina receberam 500mg/kg¹¹⁵ de carnitina diluído em salina, Grupos AuNPs + carnitina receberam 500mg/ml de AuNPs + carnitina. Já nos grupos controle e obeso foi administrado apenas salina ao mesmo tempo que os grupos tratamento. O tratamento teve duração de 4 semanas, durando até o final do experimento (décima semana).

Ao final do experimento (décima semana), houve a última pesagem dos animais, e em seguida foi realizada a eutanásia dos animais por decapitação. O método de morte por decapitação é justificado pelo fato de que os métodos químicos, utilizando fármacos, interferem nas análises bioquímicas realizadas nesse estudo¹¹⁹ (Figura 4).

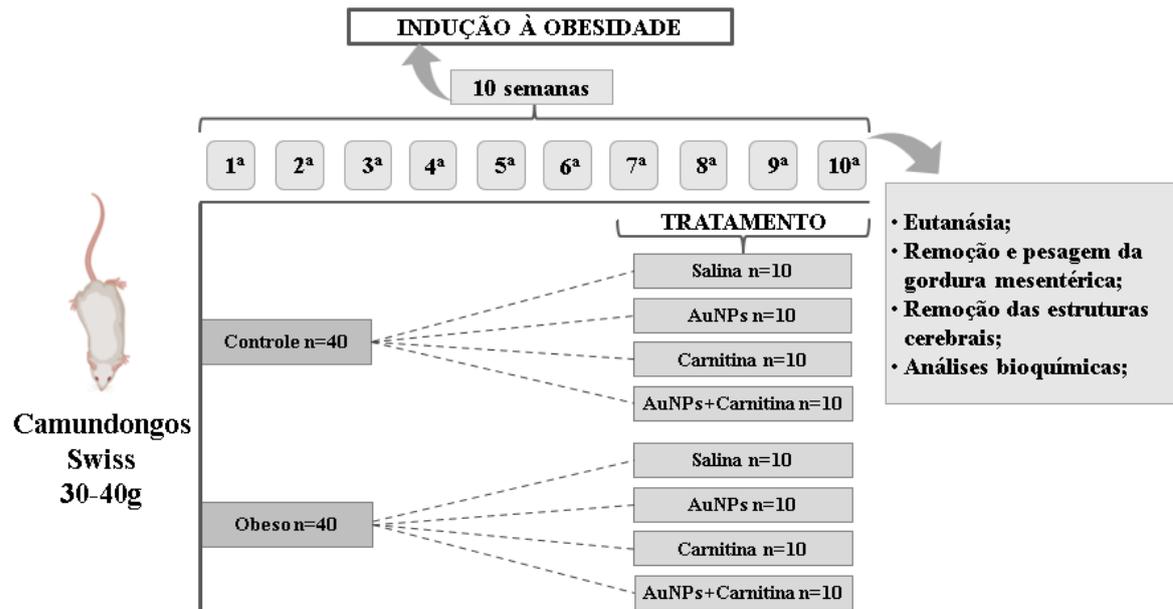


Figura 4: Delineamento experimental do estudo.

3.7 REMOÇÃO E ARMAZENAMENTO DOS TECIDOS

Após a eutanásia dos animais, a cavidade abdominal foi aberta e o tecido adiposo da região mesentérica, localizado ao longo do trato intestinal, foi retirado e pesado. O cérebro dos animais foi rapidamente removido e, na sequência, as estruturas cerebrais hipotálamo, córtex pré-frontal, hipocampo, e estriado foram isoladas. Em seguida, as amostras foram armazenadas a -80°C para serem utilizadas nas análises bioquímicas.

3.8 PESO DA GORDURA MESENTÉRICA

Após a retirada da gordura mesentérica, essa foi rapidamente pesada em balança de alta precisão, onde resultados foram expressos em gramas.

3.9 ENSAIOS BIOQUÍMICOS

3.9.1 Análise da produção de oxidantes

A produção de EROs foi determinada pela formação intracelular de DCF. Inicialmente, as amostras foram homogeneizadas, em seguida adicionadas diacetato de 2,7-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA), sendo incubadas durante 30 minutos à 37°C . A

fluorescência foi determinada utilizando comprimento de onda de 488 nm (excitação) e 525 nm (emissão), sendo a curva de calibração realizada utilizando-se DCF padrão (0-10 μM)¹²⁰. Os resultados foram expressos em fluorescência/mg de proteína.

Como indicador da formação de NO foi avaliado o metabólito estável nitrito. Assim, para mensurar o conteúdo de nitrito, as amostras foram incubadas com reagente Griess (1% sulfanilamida e 0,1% de N-1 (naphthylethylenodiamina) em temperatura ambiente por 10 minutos e a absorbância medida a 540 nm. O conteúdo de nitritos foi calculado com base numa curva padrão de 0 a 100 nM realizada com o metabólito nitrito de sódio (NaNO_2). Os resultados foram calculados em $\mu\text{mol Nitrito/mg proteína}$ ¹²¹.

As análises foram normalizadas pelo conteúdo de proteínas. As proteínas foram determinadas pelo método de Lowry e colaboradores¹²², e a albumina sérica bovina foi utilizada como padrão.

3.9.2 Análise de dano oxidativo

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 colaboradores¹²³. Nesta técnica as proteínas foram precipitadas por adição de ácido tricloroacético a 20% e dissolvidas em dinitrofenilhidrazina. A absorbância foi avaliada em 340 nm. E, os resultados foram expressos em nmol de proteínas carboniladas por mg de proteína (nmol/mg proteína).

A análise foi normalizada pelo conteúdo de proteínas. As proteínas foram determinadas pelo método de Lowry e colaboradores¹²², e a albumina sérica bovina foi utilizada como padrão.

3.9.3 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 Calabrese¹²⁴. A técnica baseia-se na inibição da reação do radical $\text{O}_2\cdot$ com adrenalina, composto que se auto oxida com variação de pH. A oxidação da adrenalina leva à formação de adrenocromo e a atividade da SOD foi determinada medindo-se a velocidade de formação do adrenocromo, determinada espectrofotometricamente a 480 nm, em um meio de reação contendo glicina-NaOH (50 mM em pH 10,2) e adrenalina 60 mM. Os resultados foram expressos em U/mg de proteína.

Os níveis de GSH foram determinados como descrito por Hissin e Hilf¹²⁵. 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 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 glutathiona reduzida foi usado para calcular os níveis de GSH nas amostras. Os resultados foram expressos em µmol/mg de proteína.

As análises de SOD e GSH foram normalizadas pelo conteúdo de proteínas. As proteínas foram determinadas pelo método de Lowry e colaboradores¹²², e a albumina sérica bovina foi utilizada como padrão.

3.9.4 Metabolismo energético

3.9.4.1 Atividade da enzima succinato desidrogenase

A atividade da enzima SDH foi determinada de acordo com o método descrito por Fischer e colaboradores¹²⁶. A um meio de incubação foi adicionado tampão fosfato de potássio 62,4 mM pH 7,4, succinato de sódio 250 mM, 2,6-DCIP e amostra. Os sistemas foram pré-incubados por 20 minutos a 30°C em banho-maria e, após, foi adicionado azida sódica 100 mM, rotenona 1 mM, 2,6-DCIP e metassulfato de fenazina. A redução do 2,6-DCIP foi determinada em 600 nm durante 5 minutos em espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em nmol/min x mg proteína. Sendo normalizadas pelo conteúdo de proteínas. As proteínas foram determinadas pelo método de Lowry e colaboradores¹²², e a albumina sérica bovina foi utilizada como padrão.

3.9.4.2 Atividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial

A atividade do complexo I foi avaliada pelo método descrito por Cassina e Radi¹²⁷, pela taxa de NADH-dependente da redução do ferricianeto. Em meio de reação 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 em espectrofotômetro de 1 em 1 min, durante 3 min, em 420 nm.

A atividade do complexo II foi avaliada pelo método descrito por Fischer e colaboradores¹²⁶. Pela diminuição da absorbância do 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 2,6-DCIP 0,5 mM., em seguida foi realizada incubação por 20 minutos a 30°C em banho-maria. Após a incubação foi adicionada azida sódica 100 mM, rotenona 2 mM e novamente 2,6-DCIP 0,5 mM, para então realizar leitura em espectrofotômetro de 1 em 1 min, por 5 min, em 600 nm.

A atividade do complexo IV foi determinada de acordo com a técnica descrita por Rustin e colaboradores¹²⁸ e calculada pela diminuição da absorbância causada pela oxidação do citocromo c reduzido. A um meio de incubação foi adicionado tampão fosfato de potássio 62,5 mM, lauril maltosídeo 125 mM, amostra diluída com tampão SETH (Sacarose, EDTA, Trizma base e Heparina) e Citocromo c 1%, para então ser realizada leitura em espectrofotômetro de 1 em 1 min, por 10 min, em 550 nm.

Todas as análises de atividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial foram normalizadas pelo conteúdo de proteínas. As proteínas foram determinadas pelo método de Lowry e colaboradores¹²², e a albumina sérica bovina foi utilizada como padrão. Os resultados da atividade de todos os complexos da cadeia respiratória mitocondrial foram expressos em nmol/min x mg proteína.

3.10 VARIÁVEIS DE ESTUDO

Quadro 2 – Variáveis de estudo.

Variáveis	Tipo	Natureza	Proposta de utilização
Obesidade	Independente	Qualitativa nominal	Sim ou Não
Peso corporal	Dependente	Quantitativa contínua	(g) Média e desvio padrão
Consumo alimentar	Dependente	Quantitativa contínua	(g/dia) Média e desvio padrão
Peso da gordura mesentérica	Dependente	Quantitativa contínua	(g) Média e desvio padrão
Tratamento AuNPs	Dependente	Quantitativa contínua	ug/kg
Tratamento carnitina	Dependente	Quantitativa contínua	mg/kg

Dosagem DCF	Dependente	Quantitativa contínua	(Fluorescência/mg de proteína) Média desvio padrão
Dano oxidativo a proteínas	Dependente	Quantitativa contínua	(nmol/mg proteína) Média desvio padrão
Atividade da SOD	Dependente	Quantitativa contínua	(U/mg de proteína) Média desvio padrão
Níveis de GSH	Dependente	Quantitativa contínua	(μ mol/mg de proteína) Média desvio padrão
Atividade da succinato desidrogenase	Dependente	Quantitativa contínua	(nmol/min x mg de proteína) Média desvio padrão
Atividade do complexo I	Dependente	Quantitativa contínua	(nmol/min x mg de proteína) Média desvio padrão
Atividade do complexo II	Dependente	Quantitativa contínua	(nmol/min x mg de proteína) Média desvio padrão
Atividade do complexo IV	Dependente	Quantitativa contínua	(nmol/min x mg de proteína) Média desvio padrão

3.11 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS

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

3.12 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

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

publicada em 2013 pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA)¹²⁹.

4. ARTIGO

O artigo contendo os resultados será submetido à revista *Molecular Neurobiology*, ISSN: 1559-1182, avaliado pela CAPES (2013-2016) com qualis A1, na área de avaliação medicina II.

Associação de nanopartículas de ouro com carnitina atenua dano hipocampal em modelo animal de obesidade

Larissa Espindola da Silva^{1*}, Jessica da Silva Abel¹, Gisele Tartari¹, Mariella Reinol da Silva¹, Mariana Pacheco de Oliveira¹, Rubya Pereira Zaccaron², Isabela da Silva Lemos³, Paulo Cesar Lock Silveira², Emilio Luiz Streck³, Gislaine Tezza Rezin¹

¹Laboratório de Neurobiologia dos Processos Inflamatórios e Metabólicos, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Sul de Santa Catarina, Tubarão, Santa Catarina, Brasil;

²Laboratório de Fisiopatologia Experimental, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, SC, Brasil;

³Laboratório de Doenças Neurometabólicas, Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, SC, Brasil.

***Autor correspondente:** Larissa Espindola da Silva. E-mail: larissa_espindola@outlook.com. Endereço: Universidade do Sul de Santa Catarina, Av. José Acácio Moreira, 787, 88704-900, Tubarão, Santa Catarina, Brasil. Telefone: + 55 48 3621 3363. Fax: +55 48 3621 3365.

Resumo

A obesidade leva a uma inflamação no tecido adiposo que pode chegar no sistema nervoso central, levando ao estresse oxidativo e disfunção mitocondrial em estruturas cerebrais. Devido à falta de tratamentos efetivos para a obesidade, torna-se necessário a busca por novas alternativas terapêuticas. As nanopartículas de ouro (AuNPs), por servirem como carreadoras de fármacos, poderiam levar a carnitina até o tecido adiposo, para que assim atue nesse tecido, aumentando a oxidação de ácidos graxos, diminuindo a inflamação e, conseqüentemente reestabelecendo a homeostase cerebral. Portanto, o objetivo desse estudo, foi investigar os efeitos das AuNPs associada a carnitina sobre parâmetros neuroquímicos de camundongos submetidos à obesidade. Para tal, foram utilizados 80 camundongos Swiss machos que receberam dieta normolipídica (grupo controle) ou dieta hiperlipídica (grupo obeso) por 10 semanas. Ao fim da sexta semana, os grupos foram divididos para o tratamento diário com salina, AuNPs (70ug/Kg), carnitina (500mg/Kg) ou AuNPs associadas a carnitina. O peso corporal foi acompanhado semanalmente. Ao fim da décima semana, foi realizada a eutanásia dos animais e a gordura mesentérica removida e pesada, assim como, as estruturas cerebrais isoladas para análises bioquímicas. Com isso, percebeu-se que a obesidade levou a danos oxidativos e disfunção mitocondrial, principalmente no hipocampo. Ainda, o tratamento com AuNPs ou associação demonstrou ser efetivo na reversão desses danos, já a carnitina demonstrou efeito periférico reduzindo o acúmulo de gordura mesentérica. Conclui-se que a associação de AuNPs com carnitina possa ser uma alternativa promissora para o tratamento da obesidade.

Palavras-chave: Obesidade, Estresse Oxidativo, Nanopartículas de Ouro, Carnitina

Abstract

Obesity leads to an inflammation in adipose tissue that can reach the central nervous system, leading to oxidative stress and mitochondrial dysfunction in brain structures. Due to the lack of effective treatments for obesity, it is necessary to search for new therapeutic alternatives. Gold nanoparticles (GNPs), as they serve as drug carriers, could take carnitine to the adipose tissue, so that it acts in this tissue, increasing the oxidation of fatty acids, decreasing inflammation and, consequently, reestablishing brain homeostasis. Therefore, the aim of this study was to investigate the effects of GNPs associated with carnitine on neurochemical parameters in mice submitted to obesity. For this, 80 male Swiss mice were used that received a normolipid diet (control group) or a high-fat diet (obese group) for 10 weeks. At the end of the sixth week, the groups were divided into daily treatment with saline, GNPs (70ug/Kg), carnitine (500mg/Kg) or GNPs associated with carnitine. Body weight was monitored weekly. At the end of the tenth week, the animals were euthanized and the mesenteric fat removed and weighed, as well as the isolated brain structures for biochemical analysis. With this, it was noticed that obesity led to oxidative damage and mitochondrial dysfunction, mainly in the hippocampus. Furthermore, treatment with AuNPs or association proved to be effective in reversing these damages, whereas carnitine showed a peripheral effect reducing the accumulation of mesenteric fat. It is concluded that the association of AuNPs with carnitine can be a promising alternative for the treatment of obesity.

Keywords: Obesity, Oxidative Stress, Gold Nanoparticles, Carnitine

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados encontrados no presente estudo, demonstram que o uso de AuNPs e carnitina não influenciaram no ganho de peso corporal, porém a carnitina levou a um menor acúmulo de gordura mesentérica. Ademais, nosso modelo experimental de obesidade levou a danos oxidativos e, em complexos da cadeia respiratória mitocondrial no SNC, em especial no hipocampo, onde o uso da AuNPs teve efeito positivo na reversão desses danos, sem perder esse efeito associado a carnitina.

Entende-se que, algumas limitações possam ter influenciado em nossos resultados, como o fato de não termos realizado análise de parâmetros inflamatórios e de peroxidação lipídica, dados esses que poderiam contribuir para responder algumas perguntas levantadas em nosso estudo. Outra limitação encontrada em nosso estudo, foi o fato de não avaliarmos possíveis efeitos tóxicos da AuNPs e da carnitina em órgãos como o fígado e os rins, esses dados poderiam nos informar possíveis efeitos negativos desse tratamento. Além disso, quando iniciamos o tratamento, não descontinuamos a dieta hiperlipídica, porém, quando pensamos em tratamento para obesidade, devemos levar em conta o controle alimentar associado, com isso poderíamos ter encontrado resultados ainda mais significativos.

Dessa forma, sugere-se que o tratamento com AuNPs associada a carnitina, possa ser promissor para pesquisas futuras, para avaliar não só possíveis efeitos adversos, mas também a associação do tratamento com um controle dietético.

REFERÊNCIAS

1. Obesity and overweight [internet]. Acesso em 17/04/2022. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>.
2. Rui L. Brain regulation of energy balance and body weight. *Rev Endocr Metab Disord*. 2013; 14(4): 387–407.
3. Tchernof A, Després J-P. Pathophysiology of Human Visceral Obesity: An Update. *Physiol Ver*. 2013; 93(1): 359–404.
4. 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.
5. Kolb R, Sutterwala FS, Zhang W. Obesity and cancer: inflammation bridges the two. *Curr Opin Pharmacol*. 2016; 29: 77–89.
6. Stenkula KG, Erlanson-Albertsson C. Adipose cell size: importance in health and disease. *Am J Physiol Integr Comp Physiol*. 2018; 315(2): R284–95.
7. Michailidou Z. Fundamental roles for hypoxia signalling in adipose tissue metabolism and inflammation in obesity. *Curr Opin Physiol*. 2019; 12: 39–43.
8. Fujisaka S, Usui I, Ikutani M, Aminuddin A, Takikawa A, Tsuneyama K, et al. Adipose tissue hypoxia induces inflammatory M1 polarity of macrophages in an HIF-1 α -dependent and HIF-1 α -independent manner in obese mice. *Diabetologia*. 2013; 56(6): 1403–12.
9. Unamuno X, Gómez-Ambrosi J, Rodríguez A, Becerril S, Frühbeck G, Catalán V. Adipokine dysregulation and adipose tissue inflammation in human obesity. *Eur J Clin Invest*. 2018; 48(9): e12997.
10. Le Thuc O, Stobbe K, Cansell C, Nahon JL, Blondeau N, Rovère C. Hypothalamic Inflammation and Energy Balance Disruptions: Spotlight on Chemokines. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2017; 8:197.
11. Jais A, Brüning JC. Hypothalamic inflammation in obesity and metabolic disease. *J Clin Invest*. 2017; 127(1): 24–32.
12. Tomasi D, Volkow ND. Striatocortical pathway dysfunction in addiction and obesity: differences and similarities. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2013; 48(1): 1–19.
13. 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.
14. Agostinho FR, Réus GZ, Stringari RB, Ribeiro KF, Ferraro AK, Benedet J, et al. Treatment with olanzapine, fluoxetine and olanzapine/fluoxetine alters citrate synthase activity in rat brain. *Neurosci Lett*. 2011; 487(3): 278–81.
15. de Mello AH, Costa AB, Engel JDG, Rezin GT. Mitochondrial dysfunction in obesity.

- Life Sci. 2018; 192: 26–32.
16. Gadde KM, Martin CK, Berthoud HR, Heymsfield SB. Obesity: Pathophysiology and Management. *J Am Coll Cardiol*. 2018;71(1):69-84.
 17. Associação brasileira para o estudo da obesidade e síndrome metabólica. Diretrizes Brasileiras de Obesidade. 4th ed. São Paulo; 2016. 186 p.
 18. Patra JK, Das G, Fraceto LF, Campos EVR, Rodriguez-Torres MDP, Acosta-Torres LS, et al. Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *J Nanobiotechnology*. 2018;16(1):71.
 19. Fujita T, Zysman M, Elgrabli D, Murayama T, Haruta M, Lanone S, et al. Anti-inflammatory effect of gold nanoparticles supported on metal oxides. *Sci Rep*. 2021; 11(1): 23129.
 20. Ghosh P, Han G, De M, Kim CK, Rotello VM. Gold nanoparticles in delivery applications. *Adv Drug Deliv Ver*. 2008; 60(11): 1307–15.
 21. Bremer J. Carnitine--metabolism and functions. *Physiol Ver*. 1983; 63(4):1420-80.
 22. Sawicka AK, Renzi G, Olek RA. The bright and the dark sides of L-carnitine supplementation: a systematic review. *J Int Soc Sports Nutr*. 2020;17(1):49.
 23. Bodaghi-Namileh V, Sepand MR, Omidi A, Aghsami M, Seyednejad SA, Kasirzadeh S, et al. Acetyl-L-carnitine attenuates arsenic-induced liver injury by abrogation of mitochondrial dysfunction, inflammation, and apoptosis in rats. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2018; 58: 11–20.
 24. Serván PR. Obesity and diabetes. *Nutr Hosp*. 2013; 28 Suppl 5: 138–43
 25. Koliaki C, Liatis S, Kokkinos A. Obesity and cardiovascular disease: revisiting an old relationship. *Metabolism*. 2019; 92: 98–107.
 26. Dixon AE, Peters U. The effect of obesity on lung function. *Expert Rev Respir Med*. 2018; 12(9): 755–67.
 27. Milaneschi Y, Simmons WK, van Rossum EFC, Penninx BW. Depression and obesity: evidence of shared biological mechanisms. *Mol Psychiatry*. 2019; 24(1): 18–33.
 28. About Obesity | World Obesity Federation [internet]. Acesso em 18/04/2022. Disponível em: <https://www.worldobesity.org/about/about-obesity>.
 29. Ministério da saúde (Brasil), Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico - VIGITEL. 1st ed. Brasília, DF; 2019. p.139.
 30. Blundell JE, Dulloo AG, Salvador J, Frühbeck G. Beyond BMI--phenotyping the obesities. *Obes Facts*. 2014; 7(5): 322–8.
 31. Janssen I, Katzmarzyk PT, Ross R. Waist circumference and not body mass index explains obesity-related health risk. *Am J Clin Nutr*. 2004; 79(3): 379–84.
 32. Abdali D, Samson SE, Grover AK. How effective are antioxidant supplements in obesity and diabetes?. *Med Princ Pract*. 2015;24(3):201-15.

33. Saely CH, Geiger K, Drexel H. Brown versus White Adipose Tissue: A Mini-Review. *Gerontology*. 2012; 58(1): 15–23.
34. Rutkowski JM, Stern JH, Scherer PE. The cell biology of fat expansion. *J Cell Biol*. 2015; 208(5): 501–12.
35. Gjermani E, Kirstein AS, Kolbig F, Kirchhof M, Bundalian L, Katzmann JL, et al. Obesity-An Update on the Basic Pathophysiology and Review of Recent Therapeutic Advances. *Biomolecules*. 2021;11(10):1426.
36. Trayhurn P. Hypoxia and Adipose Tissue Function and Dysfunction in Obesity. *Physiol Rev*. 2013; 93(1): 1–21.
37. Prins JB. Adipose tissue as an endocrine organ. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2002; 16(4): 639–51.
38. Jung CH, Kim M-S. Molecular mechanisms of central leptin resistance in obesity. *Arch Pharm Res*. 2013; 36(2): 201–7.
39. Cui H, López M, Rahmouni K. The cellular and molecular bases of leptin and ghrelin resistance in obesity. *Nat Rev Endocrinol*. 2017; 13(6): 338–51.
40. Frühbeck G, Gómez-Ambrosi J, Muruzábal FJ, Burrell MA. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol Metab*. 2001; 280(6): E827–47.
41. Mann E, Sunni M, Bellin MD. Secretion of Insulin in Response to Diet and Hormones. *Pancreapedia Exocrine Pancreas Knowl Base*. 2020; 1: 1–16.
42. Ahmed B, Sultana R, Greene MW. Adipose tissue and insulin resistance in obese. *Biomed Pharmacother*. 2021; 137: 111315.
43. Russo L, Lumeng CN. Properties and functions of adipose tissue macrophages in obesity. *Immunology*. 2018; 155(4): 407–17.
44. Guillemot-Legris O, Muccioli GG. Obesity-Induced Neuroinflammation: Beyond the Hypothalamus. *Trends Neurosci*. 2017; 40(4): 237–53.
45. González Olmo BM, Butler MJ, Barrientos RM. Evolution of the Human Diet and Its Impact on Gut Microbiota, Immune Responses, and Brain Health. *Nutrients*. 2021; 13(1): 196.
46. Nadjar A, Leyrolle Q, Joffre C, Laye S. Bioactive lipids as new class of microglial modulators: When nutrition meets neuroimmunology. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2017; 79 (Pt A): 19–26.
47. Van Dyken P, Lacoste B. Impact of Metabolic Syndrome on Neuroinflammation and the Blood–Brain Barrier. *Front Neurosci*. 2018; 12:930.
48. Zhang X, Zhang G, Zhang H, Karin M, Bai H, Cai D. Hypothalamic IKK β /NF- κ B and ER Stress Link Overnutrition to Energy Imbalance and Obesity. *Cell*. 2008;135(1):61–73.
49. Vieira GD, Sousa CM. Aspectos celulares e fisiológicos da Barreira Hematoencefálica. *J Heal Biol Sci*. 2013; 1(4): 166.

50. O'Brien PD, Hinder LM, Callaghan BC, Feldman EL. Neurological consequences of obesity. *Lancet Neurol.* 2017; 16(6): 465–77.
51. Williams LM. Hypothalamic dysfunction in obesity. *Proc Nutr Soc.* 2012; 71(4): 521–33.
52. Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M, Cerdán MG, Diano S, Horvath TL, et al. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature.* 2001; 411 (6836): 480–4.
53. Gropp E, Shanabrough M, Borok E, Xu AW, Janoschek R, Buch T, et al. Agouti-related peptide-expressing neurons are mandatory for feeding. *Nat Neurosci.* 2005; 8(10): 1289–91.
54. Farr OM, Li CR, Mantzoros CS. Central nervous system regulation of eating: Insights from human brain imaging. *Metabolism.* 2016; 65(5): 699–713.
55. Geha PY, Aschenbrenner K, Felsted J, O'Malley SS, Small DM. Altered hypothalamic response to food in smokers. *Am J Clin Nutr.* 2013; 97(1): 15–22.
56. Volkow ND, Wang G-J, Baler RD. Reward, dopamine and the control of food intake: implications for obesity. *Trends Cogn Sci.* 2011; 15(1): 37–46.
57. Lenoir M, Serre F, Cantin L, Ahmed SH. Intense Sweetness Surpasses Cocaine Reward. *PLoS One.* 2007; 2(8): e698.
58. Norgren R, Hajnal A, Mungarndee SS. Gustatory reward and the nucleus accumbens. *Physiol Behav.* 2006; 89(4): 531–5.
59. Epstein LH, Temple JL, Roemmich JN, Bouton ME. Habituation as a determinant of human food intake. *Psychol Ver.* 2009; 116(2): 384–407.
60. Wang GJ, Volkow ND, Logan J, Pappas NR, Wong CT, Zhu W, et al. Brain dopamine and obesity. *Lancet.* 2001; 357 (9253): 354–7.
61. Geiger BM, Behr GG, Frank LE, Caldera-Siu AD, Beinfeld MC, Kokkotou EG, et al. Evidence for defective mesolimbic dopamine exocytosis in obesity-prone rats. *FASEB J.* 2008; 22(8): 2740–6.
62. Davidson TL, Chan K, Jarrard LE, Kanoski SE, Clegg DJ, Benoit SC. Contributions of the hippocampus and medial prefrontal cortex to energy and body weight regulation. *Hippocampus.* 2009; 19(3): 235–52.
63. Gainey SJ, Kwakwa KA, Bray JK, Pillote MM, Tir VL, Towers AE, et al. Short-Term High-Fat Diet (HFD) Induced Anxiety-Like Behaviors and Cognitive Impairment Are Improved with Treatment by Glyburide. *Front Behav Neurosci.* 2016;10:156.
64. Wang Z, Ge Q, Wu Y, Zhang J, Gu Q, Han J. Impairment of Long-term Memory by a Short-term High-fat Diet via Hippocampal Oxidative Stress and Alterations in Synaptic Plasticity. *Neuroscience.* 2020; 424: 24–33.
65. Bragulat V, Dziedzic M, Bruno C, Cox CA, Talavage T, Considine RV, et al. Food-Related Odor Probes of Brain Reward Circuits During Hunger: A Pilot fMRI Study. *Obesity.* 2010; 18(8): 1566–71.

66. Lee THY, Yau SY. From Obesity to Hippocampal Neurodegeneration: Pathogenesis and Non-Pharmacological Interventions. *Int J Mol Sci.* 2021; 22(1):201.
67. Marseglia L, Manti S, D'Angelo G, Nicotera A, Parisi E, Di Rosa G, et al. Oxidative Stress in Obesity: A Critical Component in Human Diseases. *Int J Mol Sci.* 2014; 160(1): 378–400.
68. Usman M, Volpi E V. DNA damage in obesity: Initiator, promoter and predictor of cancer. *Mutat Res Mutat Res.* 2018; 778: 23–37.
69. Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem.* 2015; 97: 55–74.
70. Jones DP. Redefining Oxidative Stress. *Antioxid Redox Signal.* 2006; 8 (9-10): 1865–79.
71. Hernández-Aguilera A, Rull A, Rodríguez-Gallego E, Riera-Borrull M, Luciano-Mateo F, Camps J, et al. Mitochondrial Dysfunction: A Basic Mechanism in Inflammation-Related Non-Communicable Diseases and Therapeutic Opportunities. *Mediators Inflamm.* 2013; 2013: 1–13.
72. Fernández-Sánchez A, Madrigal-Santillán E, Bautista M, Esquivel-Soto J, Morales-González A, Esquivel-Chirino C, et al. Inflammation, Oxidative Stress, and Obesity. *Int J Mol Sci.* 2011; 12(5): 3117–32.
73. Muñoz A, Costa M. Nutritionally Mediated Oxidative Stress and Inflammation. *Oxid Med Cell Longev.* 2013; 2013: 1–11.
74. Nelson, D L, Cox M. *Principios de Bioquímica de Lehninger.* 6th ed. Porto Alegre: Artmed; 2014.
75. Barbosa KBF, Costa NMB, Alfenas RCG, Paula SO, Minim VPR, Bressan J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Rev Nutr.* 2010; 23(4): 629–643.
76. Drechsel DA, Estévez AG, Barbeito L, Beckman JS. Nitric oxide-mediated oxidative damage and the progressive demise of motor neurons in ALS. *Neurotox Res.* 2012;22(4):251-64.
77. Forman HJ, Zhang H. Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 2021; 20(9): 689–709.
78. Lv H, Zhen C, Liu J, Yang P, Hu L, Shang P. Unraveling the Potential Role of Glutathione in Multiple Forms of Cell Death in Cancer Therapy. *Oxid Med Cell Longev.* 2019; 10;2019:3150145.
79. Nolfi-Donagan D, Braganza A, Shiva S. Mitochondrial electron transport chain: Oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measurement. *Redox Biol.* 2020; 37: 101674.
80. Osellame LD, Blacker TS, Duchon MR. Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2012; 26(6): 711–23.
81. Costello LC, Franklin RB. Aconitase activity, citrate oxidation, and zinc inhibition in

- rat ventral prostate. *Enzyme*. 1981; 26(6):281-7.
82. Dashty M. A quick look at biochemistry: Carbohydrate metabolism. *Clin Biochem*. 2013; 46(15): 1339–52.
 83. Akram M. Citric acid cycle and role of its intermediates in metabolism. *Cell Biochem Biophys*. 2014; 68(3):475-8.
 84. Rustin P, Munnich A, Rötig A. Succinate dehydrogenase and human diseases: new insights into a well-known enzyme. *Eur J Hum Genet*. 2002; 10: 289–91.
 85. 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.
 86. Lahera V, de Las Heras N, López-Farré A, Manucha W, Ferder L. Role of Mitochondrial Dysfunction in Hypertension and Obesity. *Curr Hypertens Rep*. 2017; 19(2): 11.
 87. Brand MD, Nicholls DG. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem J*. 2011; 435(2): 297–312.
 88. Wadden TA, Tronieri JS, Butryn ML. Lifestyle modification approaches for the treatment of obesity in adults. *Am Psychol*. 2020; 75(2): 235–51.
 89. Bystrzejewska-Piotrowska G, Golimowski J, Urban PL. Nanoparticles: Their potential toxicity, waste and environmental management. *Waste Manag*. 2009; 29(9): 2587–95.
 90. Bayda S, Adeel M, Tuccinardi T, Cordani M, Rizzolio F. The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical–Physical Applications to Nanomedicine. *Molecules*. 2019; 25(1): 112.
 91. Farokhzad OC, Langer R. Impact of Nanotechnology on Drug Delivery. *ACS Nano*. 2009; 3(1): 16–20.
 92. Fischer HC, Chan WC. Nanotoxicity: the growing need for in vivo study. *Curr Opin Biotechnol*. 2007; 18(6): 565–71.
 93. Majdalawieh A, Kanan MC, El-Kadri O, Kanan SM. Recent Advances in Gold and Silver Nanoparticles: Synthesis and Applications. *J Nanosci Nanotechnol*. 2014; 14:(7) 4757–80.
 94. Fan J, Cheng Y, Sun M. Functionalized Gold Nanoparticles: Synthesis, Properties and Biomedical Applications. *Chem Rec*. 2020; 20(12): 1474–504.
 95. Singh P, Pandit S, Mokkapati VRSS, Garg A, Ravikumar V, Mijakovic I. Gold Nanoparticles in Diagnostics and Therapeutics for Human Cancer. *Int J Mol Sci*. 2018; 19(7): 1979.
 96. Koushki K, Keshavarz Shahbaz S, Keshavarz M, Bezsonov EE, Sathyapalan T, Sahebkar A. Gold Nanoparticles: Multifaceted Roles in the Management of Autoimmune Disorders. *Biomolecules*. 2021; 11(9): 1289.
 97. Khan MA, Khan MJ. Nano-gold displayed anti-inflammatory property via NF-kB pathways by suppressing COX-2 activity. *Artif Cells Nanomedicine Biotechnol*. 2018;

- 46 (sup1): 1149–58.
98. Barathmanikanth S, Kalishwaralal K, Sriram M, Pandian SR, Youn HS, Eom S, et al. Anti-oxidant effect of gold nanoparticles restrains hyperglycemic conditions in diabetic mice. *J Nanobiotechnology*. 2010; 8:16.
 99. Sumbayev VV, Yasinska IM, Garcia CP, Gilliland D, Lall GS, Gibbs BF, et al. Gold Nanoparticles Downregulate Interleukin-1 β -Induced Pro-Inflammatory Responses. *Small*. 2013; 9(3): 472–7.
 100. 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): e58208.
 101. Tsui C, Koss K, Churchward MA, Todd KG. Biomaterials and glia: Progress on designs to modulate neuroinflammation. *Acta Biomater*. 2019; 83: 13–28.
 102. Sintov AC, Velasco-Aguirre C, Gallardo-Toledo E, Araya E, Kogan MJ. Metal Nanoparticles as Targeted Carriers Circumventing the Blood–Brain Barrier. *Int Rev Neurobiol*. 2016;130:199-227.
 103. Prá M, Ferreira GK, de Mello AH, Uberti MF, Engel NA, Costa AB, et al. Treatment with isolated gold nanoparticles reverses brain damage caused by obesity. *Mater Sci Eng C*. 2021; 120: 111392.
 104. Pekala J, Patkowska-Sokoła B, Bodkowski R, Jamroz D, Nowakowski P, Lochyński S, et al. L-Carnitine - Metabolic Functions and Meaning in Humans Life. *Curr Drug Metab*. 2011; 12(7): 667–78.
 105. Ferreira GC, McKenna MC. l-Carnitine and Acetyl-l-carnitine Roles and Neuroprotection in Developing Brain. *Neurochem Res*. 2017; 42(6): 1661–75.
 106. Abolnezhadian F, Hosseini SA, Alipour M, Zakerkish M, Cheraghian B, Ghandil P, Cheraghpour M. Association Metabolic Obesity Phenotypes with Cardiometabolic Index, Atherogenic Index of Plasma and Novel Anthropometric Indices: A Link of FTO-rs9939609 Polymorphism. *Vasc Health Risk Manag*. 2020;16:249-56.
 107. Nicassio L, Fracasso F, Sirago G, Musicco C, Picca A, Marzetti E, et al. Dietary supplementation with acetyl- l -carnitine counteracts age-related alterations of mitochondrial biogenesis, dynamics and antioxidant defenses in brain of old rats. *Exp Gerontol*. 2017; 98: 99–109.
 108. Muoio DM, Noland RC, Kovalik JP, Seiler SE, Davies MN, DeBalsi KL, et al. Muscle-Specific Deletion of Carnitine Acetyltransferase Compromises Glucose Tolerance and Metabolic Flexibility. *Cell Metab*. 2012; 15(5): 764–77
 109. Al-Eisa RA, Al-Salmi FA, Hamza RZ, El-Shenawy NS. Role of L-carnitine in protection against the cardiac oxidative stress induced by aspartame in Wistar albino rats. *PLoS One*. 2018; 13(11): e0204913.
 110. Yaghubi E, Daneshpazhooh M, DJalali M, Mohammadi H, Sepandar F, Fakhri Z, et al. Effects of l-carnitine supplementation on cardiovascular and bone turnover markers in patients with pemphigus vulgaris under corticosteroids treatment: A randomized, double-blind, controlled trial. *Dermatol Ther*. 2019; 32(5):e13049.

111. Ravikumar S, Prabhu S, Vani R. Effects of L-carnitine on the erythrocytes of stored human blood. *Transfus Med.* 2020; 30(3): 215–25.
112. Talari HR, Azad ZJ, Hamidian Y, Samimi M, Gilasi HR, Ebrahimi Afshar F, et al. Effects of carnitine administration on carotid intima-media thickness and inflammatory factors in patients with polycystic ovary syndrome: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Int J Prev Med.* 2019; 10: 89.
113. Kitano Y, Hashimoto S, Matsumoto H, Yamochi T, Yamanaka M, Nakaoka Y, et al. Oral administration of l-carnitine improves the clinical outcome of fertility in patients with IVF treatment. *Gynecol Endocrinol.* 2018; 34(8): 684–8.
114. Turkevich J, Stevenson PC, Hillier J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discuss Faraday Soc.* 1951; 11: 55–75.
115. Bauomy AA. Zinc oxide nanoparticles and L-carnitine effects on neuro-schistosomiasis mansoni induced in mice. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2020; 27(15): 18699–707.
116. De Farias BX, Costa AB, Engel NA, de Souza GMP, da Rosa TC, Cargnin-Cavalho A, et al. Donepezil Prevents Inhibition of Cerebral Energetic Metabolism Without Altering Behavioral Parameters in Animal Model of Obesity. *Neurochem Res.* 2020; 45(10): 2487–98.
117. Cintra DE, Ropelle ER, Moraes JC, Pauli JR, Morari J, Souza CT, et al. Unsaturated fatty acids revert diet-induced hypothalamic inflammation in obesity. *PLoS One.* 2012;7(1):e30571.
118. 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.
119. Chorilli M, Michelin DC, Salgado HRN. Animais de laboratório: o camundongo. *Rev Ciênc Farm Básica Apl.* 2007; 28(1):11-23.
120. LeBel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol.* 1992; 5(2): 227–31.
121. Chae SY, Lee M, Kim SW, Bae YH. Protection of insulin secreting cells from nitric oxide induced cellular damage by crosslinked hemoglobin. *Biomaterials.* 2004;25(5):843-50.
122. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193(1): 265–75.
123. Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 1994;233:346-57.
124. Bannister JV, Calabrese L. Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem Anal.* 1987;32:279-312.
125. Hissin PJ, Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem.* 1976;74(1):214-26.

126. 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.
127. Cassina A, Radi R. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Arch Biochem Biophys*. 1996; 328(2): 309–16.
128. Rustin P, Chretien D, Bourgeron T, Gérard B, Rötig A, Saudubray JM, et al. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin Chim Acta*. 1994; 228(1):35-51.
129. 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). Brasília, DF; 2013. p. 1–50.

ANEXO

ANEXO A- Parecer Aprovação do Comitê de Ética



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

Palhoça, 30 de março de 2021

Registro na CEUA Nº 21.008.4.01.IV

Ao Pesquisador/Professor(a): Gislaine Tezza Rezin

Prezado(a),

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

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

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

Atenciosamente,

Prof. Sandro Meilm Sgrott