

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

Beatriz Lopes Tecedor Bassi

**NANOPARTÍCULAS DE OURO BIOFUNCIONALIZADAS COM
GLUTATIONA: UMA NOVA ABORDAGEM NEUROPROTETORA NO
ESTUDO DA ISQUEMIA CEREBRAL**

Belo Horizonte

2024

Beatriz Lopes Tecedor Bassi

**NANOPARTÍCULAS DE OURO BIOFUNCIONALIZADAS COM
GLUTATIONA: UMA NOVA ABORDAGEM NEUROPROTETORA NO
ESTUDO DA ISQUEMIA CEREBRAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências Biológicas:
Fisiologia e Farmacologia da Universidade
Federal de Minas Gerais como requisito
parcial para obtenção do título de Doutor

Orientador: Prof. Dr. André Ricardo Massensini

Coorientadora: Profa. Dra. Gisele Eva Bruch

Belo Horizonte

2024

043

Bassi, Beatriz Lopes Tecedor.

Nanopartículas de ouro biofuncionalizadas com glutathione: uma nova abordagem neuroprotetora no estudo da isquemia cerebral [manuscrito] / Beatriz Lopes Tecedor Bassi. – 2024.

197 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. André Ricardo Massensini. Coorientadora: Profa. Dra. Gisele Eva Bruch.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

1. Fisiologia. 2. Isquemia Encefálica. 3. Nanopartículas Metálicas. 4. Neuroproteção. I. Massensini, André Ricardo. II. Bruch, Gisele Eva. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 612



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS
GERAIS

COLEGIADO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM

FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA - ICB/UFMG FOLHA DE

APROVAÇÃO DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO Nº 386 DE

BEATRIZ LOPES TECEDOR BASSI

TÍTULO:

**"Nanopartículas de Ouro Biofuncionalizadas Com Glutathione:
Uma Nova Abordagem Neuroprotetora no Estudo da Isquemia
Cerebral"**

ESTUDANTE: BEATRIZ LOPES TECEDOR BASSI
ORIENTADOR: ANDRÉ RICARDO MASSENSINI

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia **09 de setembro de 2024**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

Profa. Dra. Sílvia Ligório Fialho - FUNED
Profa. Dra. Luciene Bruno Vieira - ICB/UFMG
Prof. Dr. Mauro Cunha Xavier Pinto - DFAR/UFG
Dr. Sérgio Ricardo Aluotto Scalzo Júnior - ICB/UFMG
Profa. Dra. Gisele Eva Bruch - Coorientadora - FAMINAS
Prof. Dr. André Ricardo Massensini - Orientador - ICB/UFMG

Belo Horizonte, 09 de setembro de 2024



Documento assinado eletronicamente por **Sérgio Ricardo Aluotto Scalzo Júnior, Usuário Externo**, em 19/09/2024, às 11:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Silvia Ligorio Fialho, Usuário Externo**, em 19/09/2024, às 11:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Andre Ricardo Massensini, Professor do Magistério Superior**, em 19/09/2024, às 13:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Andre Ricardo Massensini, Professor do Magistério Superior**, em 19/09/2024, às 13:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Mauro Cunha Xavier Pinto, Usuário Externo**, em 19/09/2024, às 14:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luciene Bruno Vieira, Professora do Magistério Superior**, em 23/09/2024, às 08:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gisele Eva Bruch, Usuário Externo**, em 30/09/2024, às 17:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3564058** e o código CRC **982BAFA5**.

Referência: Processo nº 23072.253632/2024-10

EI nº 3564058

S

Trabalho desenvolvido no Núcleo de Neurociências (NNC), do Departamento de Fisiologia e Biofísica, no Instituto de Ciências Biológicas (ICB) e no Laboratório de Segurança, Meio Ambiente e Saúde (SMS) do Centro de Tecnologias em Nanomateriais e Grafeno (CTNANO), da Universidade Federal de Minas Gerais, com o auxílio das seguintes agências de fomento:

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES;
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq;
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG.

aos meus avós, meus pés e braços na caminhada desde pequena
à minha mãe, exemplo de amor e dedicação,
ao meu irmão, meu melhor amigo

AGRADECIMENTOS

Há tantas pessoas para agradecer que realmente não sei por onde começar. Nesta jornada de 8 anos, começando pelo meu mestrado e agora finalizando com o doutorado, tive o prazer e a alegria de conhecer tantas pessoas boas, amigas e companheiras que puderam dividir comigo momentos inesquecíveis. Se não fosse pelo 8sim9 do meu orientador André Massensini, eu nem estaria aqui. Ele aceitou uma menina que não tinha experiência com pesquisa, vinda de outro estado e com isso, abriu tantas portas que nem consigo mais contar. Meu muito obrigado por todo conhecimento, apoio e confiança em mim em todos esses anos. Obrigada por me permitir fazer parte da família NNC.

Seis meses depois da minha entrada no NNC, após apresentar um seminário que vai ficar na minha memória para sempre, o André me apresentou a nova pós-doc do grupo, a Gisele Bruch. Nos demos bem desde o começo e seu suporte, amizade e ensinamentos ficarão em mim para sempre. Tive uma grande sorte de conhecê-la e com isso ela se tornou minha coorientadora e continuou ao meu lado até o final do meu doutorado. Meu muito obrigado por tudo, amiga! O NNC me proporcionou conhecer o Flávio Mourão e o Leonardo Guarnieri, dois pós-docs que me guiaram até o final desta jornada com muita atenção, carinho e companheirismo. Não tenho palavras para agradecer o tanto que aprendi e venho aprendendo com vocês nestes últimos anos. Meu muito obrigada por tudo. Também tive o prazer de conhecer o professor Bruno, que com nossas longas conversas, me ensinou muito sobre a vida, me apoiou e gerou muita diversão. No meu doutorado, decidi mudar de foco de tratamento para isquemia e preferi trabalhar com nanotecnologia. Por meio da Gisele, tive a honra de conhecer um dos maiores nomes da área, o professor Luiz Orlando Ladeira, que com muita calma, paciência e carinho, me guiou pelo mundo das nanopartículas de ouro. Meu eterno obrigado por todos os telefonemas, ajudas, contas e explicações, com certeza sei que devo ter dado muito trabalho.

Uma das coisas que mais aprendemos no laboratório é que ciência não se faz sozinho, e eu tenho a maior prova de todas. No final do meu mestrado, uma nova aluna chegou no laboratório pretendendo uma posição de doutorado com o André. Ela é do Maranhão, mas fez a faculdade no Rio Grande do Sul haha bem viajada. Eu apresentei a UFMG para a Aline em um feriado, e desde esse dia, nunca mais paramos de trabalhar juntas. Nós entramos na mesma seleção de doutorado, somos

farmacêuticas e mestres em Neurociências!! Quanta coincidência!!!! Acabamos trilhando essa jornada juntas, entre noites e madrugadas, entre erros e acertos, entre alegrias e tristezas, entre dedicação e cansaço. Trabalhando juntas, conseguimos finalizar juntas nossos doutorados e só tenho a agradecer por toda força e companheirismo nestes últimos 4 anos. Mas não somente tive a Aline como companheira, nossos ICs líderes sempre estiveram ao nosso lado, ajudando nas dificuldades e nas diversões. Muito obrigada ao Lucas, por ser nosso braço direito, e às meninas Ariadne e Camilla, por todo esforço, dedicação e risadas no laboratório. Mesmo tendo chegado no começo deste ano, meu obrigada à Enoy, a nova aluna de IC do nosso grupo.

Meu muito obrigada à Loudi que me ajudou demais com minhas soluções de nanopartículas e que no fim da minha jornada foi essencial para minhas preparações! Muito obrigada às professoras Clésia e Letícia por permitirem acesso ao laboratório da Química para podermos fazer as análises de biodistribuição, vocês nos salvaram e não sabem quanto!! Muito obrigada ao Jamil, técnico da Bioquímica, que sempre nos recebeu com piadas e sorrisos nas tantas e tantas vezes que precisei ir centrifugar, liofilizar e tirar dúvidas sobre alguma técnica. Espero que aproveite muito sua filhinha como o pai babão e orgulhoso que sempre demonstrou ser. Muito obrigada ao CTNANO e ao SMS, coordenado pelo professor Ary, que abriram as portas para que eu pudesse aprender e sintetizar muitas nanopartículas, em especial à Iara, Carol e Kennedy. Muito obrigada a todos os professores que me ensinaram durante esses últimos 8 anos nas mais diversas disciplinas e seminários. Com vocês, sei que conseguirei voar mais alto e atingir cada vez mais o que meu coração deseja. Com vocês, aprendi muitas lições de livros e de vida. Obrigada ao laboratório do professor Frezard e ao professor Pedro por me permitirem realizar alguns experimentos de caracterização das minhas nanopartículas, em especial à Sabrina por se disponibilizar a me ajudar. Muito obrigada ao professor Cristiano Fantini e ao Rubens, seu aluno de IC, por toda ajuda e ensinamento sobre os nanotubos de carbono e sua física.

Um agradecimento especial ao professor Márcio e à professora Grace que fazem parte do NNC e que sempre me ensinaram muito e me ajudaram no meu caminho acadêmico. Obrigada ao professor Mazoni por ser nossa ponte quando mais precisamos. Meu muito obrigada à Lorena, que quando entrei no laboratório era uma mestranda e agora se tornou uma pós-doc incrível, que desde o começo do

meu mestrado me ajudou no meu caminho científico e se tornou alguém que admiro muito.

O NNC não me proporcionou somente crescimento científico, mas também, humano. Os amigos que fiz vão ficar em meu coração para sempre, com nossas copinhas, conversas, saídas e gargalhadas a todo momento. Não consigo citar todos que passaram por este laboratório nos últimos 8 anos, mas saibam que nossa amizade foi e sempre será extremamente importante para mim, me ajudando a ser uma pessoa melhor e uma cientista mais feliz. Obrigada por toda a alegria proporcionada!!!! Na verdade, dentre esse seleto grupo, duas se destacam como minhas amigas de vida! Assim que acabou a pandemia, uma menina nova ia chegar e estava pedindo ajuda para se instalar em BH. Como eu morava sozinha, decidi falar com ela e perguntar se queria dividir comigo. O que era para ser uma conversa por vídeo de 15 minutos, durou horas que se tornaram dias e agora em agosto completaram dois anos. Não tenho palavras para agradecer nossa amizade, Paula!! Nossas noites conversando, nossas manhãs indo para a UFMG, nossos almoços de fim de semana em que nos dividimos para cada uma fazer uma semana, rigorosamente acordados hahaha obrigada por me apresentar uma amizade genuína, divertida, amável e respeitosa com todos esses anos. Você foi muito especial para mim e espero do fundo do meu coração que você alcance todos os seus desejos. Outra amizade especial foi a Elisa que me guiou nos momentos difíceis e tensos que meu doutorado me proporcionou! Sempre um ombro amigo, uma palavra de acalento e conversas positivas que levarei para sempre em meu coração. Amiga, tenho certeza de que você sempre irá brilhar mais que o sol!!!

Muito obrigada às minhas terapeutas por me guiarem nos caminhos da mente por todos esses anos e me ajudarem a finalizar mais uma trajetória em minha vida! Meu muito obrigada a uma pessoa que entrou na minha vida há pouco tempo, mas que já fez uma enorme diferença, se tornando mais que um amigo, me ajudando, me acalutando, me dando forças para terminar uma jornada tão cansativa e pesada e por me mostrar que esta mesma jornada pode ser leve e alegre se olhada por outro ponto de vista! Meus mais sinceros obrigados ao meu namorado Vinícius!!!

Por fim e mais importante, a minha reverência à minha família!!! Muito obrigada aos meus avós, por me permitirem voar e me proporcionarem tantas possibilidades na vida... obrigada ao meu avô por ser exemplo de amor, carinho e dedicação diária e muito obrigada à minha avó, que me ensinou os primeiros

passos, mas infelizmente não pode ver estes finais. Muito obrigada à minha mãe e melhor amiga por me apoiar indubitavelmente em todas as minhas escolhas e sendo meu apoio e morada nos erros e dificuldades. Muito obrigada ao meu irmão por ser meu melhor amigo e me acompanhar nas maiores aventuras dessa vida. Obrigada ao Duke por me trazer tanta alegria e diversão. E obrigada ao meu pai que, mesmo somente nos últimos anos, vem sendo mais presente e me ajudando quando preciso. Bom, assim encerro mais essa etapa da minha vida, ao lado de amigos e amores e nos ombros de gigantes!!

Mesmo não sabendo qual será meu futuro, estou muito animada em continuar essa grande jornada, que é a vida!!!!

**<Nada na vida é para ser temido, apenas para ser compreendido.
Agora é a hora de entender mais, para que possamos temer menos.=**

Marie Curie

Prêmio Nobel de Física, 1903, e de Química, 1911

RESUMO

As nanopartículas de ouro (AuNP) têm atraído atenção como potenciais agentes neuroprotetores em modelos animais de doenças cerebrais, incluindo o acidente vascular cerebral isquêmico, que é caracterizado pela oclusão ou bloqueio de um vaso sanguíneo. Estudos já mostraram uma diminuição no volume do infarto, recuperação funcional e atenuação do estresse oxidativo e da inflamação em animais tratados com AuNPs e submetidos à isquemia. Além de atuar como tratamento, esses nanomateriais também funcionam como nanocarreadores, aumentando a biodistribuição e a eficácia de substâncias que são rapidamente degradadas pelo corpo, como a glutathione (GSH). A GSH é o peptídeo em maior quantidade no corpo e é um elemento chave no equilíbrio redox. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar a eficácia do tratamento com nanopartículas de ouro funcionalizadas com glutathione nos efeitos da isquemia cerebral. As nanopartículas de ouro foram sintetizadas e então biofuncionalizadas com GSH (GSH-AuNP). Para a caracterização, foi realizada uma análise da forma e massa de ouro por Ressonância Plasmônica de Superfície (SRP), medida por espectrofotometria UV-VIS; sua carga (potencial zeta, PZ) também foi medida. Para o modelo de isquemia cerebral, foram utilizadas fatias de hipocampo de 36 camundongos machos CD1 de 9- 11 semanas de idade (CEUA/UFMG: 270/2020). As fatias foram divididas em dois grupos: 1)- controle, com Fluido Cérebro-espinhal Artificial (aCSF) com glicose e borbulhado com O₂ e CO₂, e 2)- isquemia com aCSF sem glicose e borbulhado com N₂ e CO₂. Cada grupo experimental foi subdividido em controle aCSF, GSH (100 µg/mL), AuNP (8 ou 800 µg/mL) e curva de concentração x resposta GSH-AuNP (0,08 - 800 µg/mL). O período de isquemia durou 60 minutos e o de reperusão 120 minutos. O dano celular foi analisado pela liberação de lactato desidrogenase (LDH) e a neurotoxicidade pela liberação de glutamato. Cérebro, rim e fígado foram dissecados 24h após a injeção intravenosa de 1 mg/kg de ouro para análise da biodistribuição. Os resultados foram analisados usando Two-Way ANOVA (p<0,05). As AuNPs mostraram um λ_{max} de 530 nm e uma carga de -31,4 mV, enquanto as AuNP-GSH tinham 520 nm e -27 mV, sendo sua forma esférica inferida e mostrando o deslocamento do pico máximo e a carga causados pela modificação da superfície pela ligação de GSH. A massa de ouro na solução de AuNP foi de 82 mg/L, enquanto a de GSH-AuNP foi de 44 mg/L, causada provavelmente pela centrifugação deste último. Entre os grupos controle, observou-se maior dano celular e liberação de glutamato nas fatias submetidas à isquemia (5,132 vs 15,933 U/mg de proteína, p<0,0001). Observou-se neuroproteção no grupo tratado com GSH-AuNP, em comparação com o grupo controle, para a análise de LDH (3,629 vs 15,933 U/mg de proteína, p<0,001) e uma diminuição significativa na liberação de glutamato (14,912 vs 28,280 nmol/mg de proteína, p=0,028) durante o processo isquêmico. Foi

possível encontrar AuNP e GSH-AuNP no fígado, enquanto somente o grupo GSH-AuNP foi encontrado no rim. A síntese e modificação bem-sucedida de AuNP com GSH, conforme demonstrado pelos resultados de caracterização, bem como a diminuição da liberação de LDH e glutamato, destacam o potencial das GSH-AuNP como agente protetor contra a toxicidade celular.

Palavras-chave: isquemia cerebral; nanopartículas de ouro; neuroproteção; biodistribuição

ABSTRACT

Gold nanoparticles (AuNP) have garnered attention as potential neuroprotective agents in animal models of brain diseases, including ischemic stroke, which is characterized by the occlusion or blockage of a blood vessel. Studies have already shown a decrease in infarct volume, functional recovery, and attenuation of oxidative stress and inflammation in animals treated with AuNPs and submitted to ischemia. In addition to acting as a treatment, these nanomaterials also act as nanocarriers, increasing the biodistribution and effectiveness of substances that are rapidly degraded by the body, such as glutathione (GSH). GSH is the peptide in the greatest amount in the body and is a key element in redox balance. Thus, this study aimed to evaluate the effectiveness of treatment with glutathione-functionalized gold nanoparticles in the effects of cerebral ischemia. Gold nanoparticles were synthesized and then biofunctionalized with GSH (GSH-AuNP). For characterization, an analysis of the shape and mass of gold was performed by Surface Plasmonic Resonance (SRP), measured by UV-VIS spectrophotometry; their charge (zeta potential, ZP) was measured. For the cerebral ischemia model, hippocampal slices from 36 male CD1 mice aged 9-11 weeks were used (CEUA/UFGM: 270/2020). The slices were divided into two groups: 1) control, with aCSF (Artificial Cerebrospinal Fluid) containing glucose and bubbled with O₂ and CO₂, and 2) ischemia with ACSF without glucose and bubbled with N₂ and CO₂. Each experimental group was further subdivided into PBS control, GSH (100ug/mL), AuNP (8 or 800 ug/mL) and GSH-AuNP concentration x response curve (0,08 - 800ug/mL). The ischemia period lasted 60 minutes, followed by a 120 minutes reperfusion period. Cell damage was assessed by lactate dehydrogenase (LDH) release, and neurotoxicity by glutamate release. Brain, kidney, and liver were dissected 24h after intravenous injection of 1mg/kg Au for biodistribution analysis. Results were analyzed using Anova Two-Way ($p < 0,05$). The AuNP showed a λ_{max} of 530nm and a charge of -31.4mV, while the GSH-AuNP had a 520nm and -27mV, their spherical shape being inferred and showing the shift of the maximum peak and the charge caused by the modification of the surface by GSH binding. The mass of gold in the AuNP solution was 82mg/L, while that of GSH-AuNP was 44mg/L likely due to centrifugation of the latter. Among control groups, it was observed greater cellular damage and glutamate release in the slices submitted to ischemia (5,132 vs 15,933 U/mg protein, $p < 0,0001$). It was observed

neuroprotection in the treatment group with GSH-AuNP compared to the control group in LDH analysis (3,629 vs 15,933 U/mg protein, $p<0,001$) and a significant decrease in glutamate release (14,912 vs 28,280 nmol/mg protein, $p=0,028$) during the ischemic process. It was possible to find AuNP and GSH-AuNP in the liver, while only the GSH- AuNP group was found in the kidney. The successful synthesis and modification of AuNP with GSH, as demonstrated by the characterization results, as well as decrease of LDH and glutamate release, highlight the potential of GSH-AuNP as a protective agent against cellular toxicity.

Keywords: ischemic stroke; gold nanoparticles; neuroprotection; biodistribution

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Comparativo entre nanomateriais e materiais biológicos	26
Figura 2: Representação do processo isquêmico e hemorrágico.....	29
Figura 3: Danos cerebrais causados por um evento isquêmico ao longo do tempo	30
Figura 4: Esquema dos mecanismos fisiopatológicos durante uma isquemia cerebral	33
Figura 5: Vias apoptóticas – Extrínseca e Intrínseca	37
Figura 6: Imagem esquemática da barreira hematoencefálica	41
Figura 7: Representação dos diferentes nanomateriais à base de ouro	46
Figura 8: Passo a passo da síntese da glutathiona.....	50
Figura 9: Vias de antioxição.....	51
Figura 10: Efeito da ressonância plasmônica de superfície em nanopartículas de ouro	53
Figura 11: Esquema da funcionalização das AuNPs com GSH.....	65
Figura 12: Esquema da síntese das nanopartículas de ouro	70
Figura 13: Esquema da síntese das nanopartículas de ouro funcionalizadas com glutathiona.....	71
Figura 14: Delineamento experimental do modelo de privação de oxigênio e glicose	75
Figura 15: Gráfico da caracterização da forma das AuNP e GSH-AuNP por espectroscopia de absorbância UV-Vis.....	84
Figura 16: Gráfico da caracterização do potencial zeta (mV) das AuNP e GSH-AuNP analisado no ZetaSizer	85
Figura 17: Caracterização do tamanho das AuNP e GSH-AuNP por microscopia eletrônica de transmissão (TEM).....	86
Figura 18: Efeitos dos grupos tratamento no dano celular em fatias hipocampais submetidas ao modelo de privação de oxigênio e glicose.....	89
Figura 19: Liberação de glutamato em fatias hipocampais submetidas ao modelo de privação de oxigênio e glicose	90
Figura 20: Efeitos dos grupos tratamento no dano celular em fatias hipocampais submetidas ao modelo de privação de oxigênio e glicose na reperusão	91
Figura 21: Atividade de Caspase-3 ativa em fatias hipocampais submetidas ao modelo de privação de oxigênio e glicose.....	92

Figura 22: Atividade de Caspase-9 ativa em fatias hipocampais submetidas ao modelo de privação de oxigênio e glicose.....	93
Figura 23: Análise da distribuição de ouro no cérebro, fígado e rim após 24h da injeção	94
Figura 24: Análise da distribuição de ouro no fígado após 24h da injeção.....	94
Figura 25: Análise da distribuição de ouro no rim após 24h da injeção.....	95
Figura 26: Análise da distribuição de ouro nas estruturas cerebrais após 24h da injeção	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Modelo de Tabela para quantificação de ouro em soluções coloidais formadas por nanoesferas de ouro	71
Tabela 2: Lista de equipamentos utilizados nos experimentos	79
Tabela 3: Lista de soluções utilizadas nos experimentos	80
Tabela 4: Lista de reagentes utilizados nos experimentos.....	82
Tabela 5: Taxa de ligação da glutathione às nanopartículas em porcentagem	86
Tabela 6: Quantificação de ouro e nanopartículas nas soluções de AuNP e GSH-AuNP	87

LISTA DE ABREVIATURAS

NP	Nanopartículas
EUA	Estados Unidos da América
ERO	Espécies reativas de oxigênio
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α
NO	Óxido nítrico
AuNP	Nanopartículas de ouro
GSH	Glutathione
GSH-AuNP	Nanopartículas de ouro funcionalizadas com GSH
AVE	Acidente Vascular Encefálico
BHE	Barreira hematoencefálica
SLNs	Nanopartículas lipídicas sólidas
RM	Razão molar
TEM	Microscopia eletrônica de transmissão
EPS	Exopolissacarídeo
NaBH ₄	Borohidreto de sódio
HAuCl ₄	Ácido cloroáurico
RPS	Ressonância plasmônica de superfície
MPS	Sistema fagocítico mononuclear
RES	Sistema reticuloendotelial
MCAo	Oclusão da artéria cerebral média
BCAAo	Oclusão transitória bilateral da artéria carótida comum
NADP ⁺	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina hidratado
NaOH	Hidróxido de sódio
BSA	Albumina Sérica Bovina

LDH	Lactato desidrogenase
ACSF	Fluido Cerebro-Espinal Artificial
OGD	Privação de oxigênio e glicose, do inglês <Oxygen and glucose deprivation=
nOGD	Não privação de oxigênio e glicose, do inglês <No oxygen and glucose deprivation=
MM	Massa molar
D	Densidade
UV-Vis	Ultravioleta visível
SNC	Sistema Nervoso Central
ATP	Adenosina trifosfato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EPR	Efeito de permeabilidade e retenção
Bid	Agonista de Morte do Domínio de Interação BH3

<A medida da grandeza de uma ideia científica é o quanto ela estimula o pensamento e abre novas linhas de pesquisa.=

Paul Dirac

Prêmio Nobel de Física, 1933

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
1.1 Nanotecnologia.....	25
1.2 Acidente Vascular Encefálico	27
1.2.1 Epidemiologia	27
1.2.2 Fisiologia do AVE.....	28
1.2.3 Acidente Vascular Encefálico isquêmico	29
1.2.3.1 <i>Morte celular: apoptose celular</i>	33
1.2.3.1.1 Definição.....	33
1.2.3.1.2 Caspases.....	34
1.2.3.1.3 Vias intrínseca e extrínseca	35
1.2.3.1.4 Via intrínseca	36
1.2.3.1.5 Via Extrínseca.....	36
1.2.3.1.6 Caspases na isquemia cerebral	36
1.3 Barreira Hematoencefálica.....	39
1.4 Tratamentos existentes para o AVE	42
1.5 Nanocarreadores	43
1.6 Nanoesferas de ouro e seus usos.....	45
1.6.1 Nanoesferas de ouro e seus redutores	46
1.6.2 Glutathione	50
1.6.3 Propriedades ópticas das AuNPs.....	53
1.6.4 Superfície da nanopartícula	54
1.6.5 Tamanho das nanoesferas de ouro	56
1.6.6 Biodistribuição	59
1.7 Nanoesferas de ouro e o AVE isquêmico.....	62
2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	67
2.1 Justificativa	67
2.2 Objetivo geral.....	67
2.2.1 Objetivos específicos	68
3 MÉTODOS	70
3.1 Síntese de nanopartículas de ouro	70
3.2 Síntese de nanopartículas de ouro com GSH (GSH-AuNP)	70
3.3 Caracterização das nanopartículas de ouro	71

3.4 Animais.....	73
3.5 Preparação do tecido cerebral.....	73
3.6 Privação de oxigênio e glicose (OGD) – modelo de dano isquêmico <i>in vitro</i>	73
3.7 Ensaio para quantificação de lactato desidrogenase liberada	75
3.8 Ensaio para quantificação de glutamato liberado.....	76
3.9 Ensaio para quantificação da atividade de caspases.....	76
3.9.1 Quantificação da atividade de caspase-3.....	76
3.9.2 Quantificação da atividade de caspase-9.....	77
3.10 Dosagem de proteínas	78
3.11 Análise estatística	78
3.12 Biodistribuição.....	78
4 RESULTADOS	84
4.1 Síntese e caracterização das nanopartículas	84
4.1.1 Síntese	84
4.1.2 Caracterização quanto a forma das nanopartículas	84
4.1.3 Caracterização quanto a carga das nanopartículas	84
4.1.4 Caracterização quanto o tamanho e formato das nanopartículas	85
4.1.5 Caracterização quanto a taxa de ligação da glutathione	86
4.1.6 Caracterização quanto a concentração de nanopartículas.....	87
4.2 Tratamento da isquemia cerebral no período da isquemia	88
4.2.1 Análise do dano celular	88
4.2.2 Análise da liberação de glutamato	89
4.3 Tratamento da isquemia cerebral no período da reperfusão	90
4.3.1 Análise do dano celular	90
4.3.2 Análise da atividade de caspases	91
4.3.2.1 Caspase-3	92
4.3.2.2 Caspase-9	92
4.4 Biodistribuição.....	93
5 DISCUSSÃO	97
5.1 Síntese e caracterização das nanopartículas	97
5.1.1 Síntese	97
5.1.2 Caracterização quanto a forma das nanopartículas	98
5.1.3 Caracterização quanto a carga das nanopartículas	99

5.1.4 Caracterização quanto o tamanho das nanopartículas	100
5.1.5 Caracterização quanto a taxa de ligação da glutathione	101
5.1.6 Caracterização quanto a concentração de ouro	102
5.2 Tratamento da isquemia cerebral.....	103
5.2.1 Período isquemia.....	103
5.2.1.1 <i>Análise do dano celular</i>	103
5.2.1.2 <i>Análise da liberação de glutamato</i>	105
5.2.2 Período reperfusão	108
5.2.2.1 <i>Análise do dano celular</i>	108
5.2.2.2 <i>Análise da morte celular</i>	108
5.2.2.2.1 Atividade das caspases -3 e -9	108
5.3 Biodistribuição.....	110
6 CONCLUSÃO	115
7 REFERÊNCIAS.....	117
8 ANEXO 1: Cálculo de moléculas de GSH ligadas a uma AuNP.....	139
9 ANEXO 2: Documentos do comitê de ética em uso de animais	142
10 ANEXO 3: Estudo da segurança de nanotubos de carbono em cultura celular	149

1 INTRODUÇÃO

1.1 Nanotecnologia

A palavra <nanotecnologia= vem do grego **nanos**: anão (bilionésima parte de uma unidade de medida $\times 10^{-9}$), **techne**: técnica e **logos**: argumento, discussão. A primeira vez que o termo apareceu foi no ano de 1959, em uma palestra do ganhador do prêmio Nobel de Física de 1965, Richard Feynman, na reunião anual da American Physical Society. Na palestra, intitulada: <Há mais espaço lá embaixo=, o físico teórico discutiu sobre o controle e a manipulação da matéria em escala atômica, hipotetizando que não existe qualquer obstáculo teórico à construção de pequenos dispositivos compostos por elementos muito pequenos, no limite atômico (FEYNMAN, 1960). Em 1974, Norio Taniguchi, professor da Tokyo Science University, cunhou o termo <nanotecnologia= e atualmente sua definição engloba a fabricação, a manipulação e a aplicação de materiais ou dispositivos na escala nanométrica, definida como tendo pelo menos uma das dimensões inferior a 100 nm (BAYDA et al., 2019).

A unidade básica da nanotecnologia é a nanopartícula, que segundo a Comissão Europeia de 10 de junho de 2022, é =um material natural, incidental ou fabricado, constituído por partículas sólidas, presentes isoladamente ou como partículas constituintes identificáveis de agregados ou aglomerados, e em que, na distribuição numérica da dimensão, 50 % ou mais destas partículas satisfazem, pelo menos, uma das seguintes condições: a) Uma ou várias dimensões externas da partícula situam-se na gama de tamanhos entre 1 nm e 100 nm; b) A partícula tem uma forma alongada, como uma haste, uma fibra ou um tubo, em que duas dimensões externas são inferiores a 1 nm e a outra dimensão é superior a 100 nm; c) A partícula tem uma forma laminar, em que uma dimensão externa é inferior a 1 nm e as outras dimensões são superiores a 100 nm= (CARLANDER; SKENTELBERY, 2021) (Figura 1).

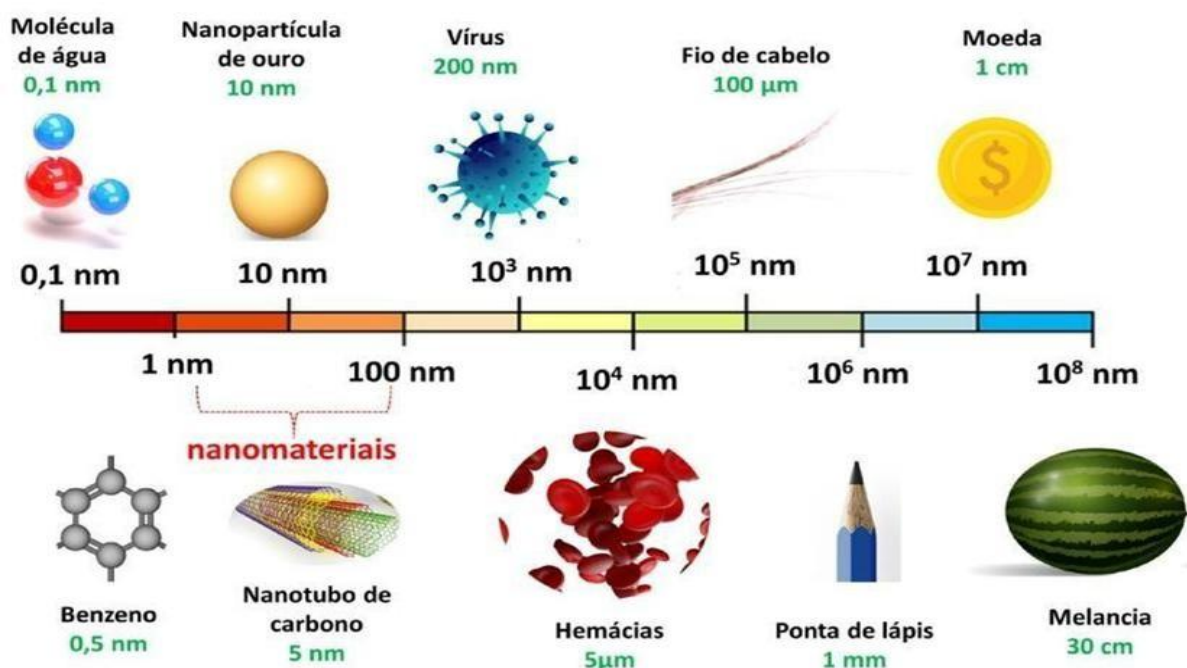


Figura 1: Comparativo entre nanomateriais e materiais biológicos. Os nanomateriais estão representados na escala nanométrica (1 a 100 nm) sendo a molécula de água 10x menor e uma moeda 107x maior. Adaptado de Sanfelice et al, 2022. Acesso: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1148352/1/P-INTRODUCAO-A-NANOTECCNOLOGIA.pdf>. Acesso em: 26 de julho de 2024.

A nanotecnologia vem sendo utilizada em diversas áreas do conhecimento, como, por exemplo, na fabricação de microchips (XU et al., 2020), semicondutores para painéis (BANIN et al., 2020), nanofiltração (TLILI; ALKANHAL, 2019), assim como na indústria automobilística, têxtil e alimentícia (MALIK; MUHAMMAD; WAHEED, 2023; PRIMOŽIČ; KNEZ; LEITGEB, 2021; SHAHEEN, 2022). Nos últimos anos, ela tem adentrado o mundo da biomedicina na fabricação de cosméticos, fármacos e biossensores (GUPTA et al., 2022; KRUSS et al., 2017). Existem diversos tipos de nanomateriais, como por exemplo, os quantum dots, os nanorods, os lipossomas e nanofilmes.

Estes nanomateriais vem tendo bastante destaque nos últimos anos e novas descobertas a seu respeito, vem ajudando no diagnóstico e tratamento de diversas doenças, principalmente doenças do sistema nervoso central (SNC), como o Alzheimer, doença de Huntington e Parkinson (AGRAWAL et al., 2018; GHAZY et al., 2021; KHATRI et al., 2023; LESZEK et al., 2017; SINGH et al., 2022; VALADÃO et al., 2022). Dentre os diferentes nanomateriais, neste trabalho, foram escolhidas as nanoesferas de ouro, que já têm demonstrado ações promissoras nos sistemas biológicos, tanto como tratamento, quanto como diagnóstico (BARANI et al., 2021).

Mais especificamente, escolhemos estudar a ação destas nanopartículas como tratamento e sistema de entrega de drogas no acidente vascular encefálico isquêmico (AVE).

1.2 Acidente Vascular Encefálico

1.2.1 Epidemiologia

O Acidente Vascular Encefálico (AVE), popularmente conhecido como derrame, é a primeira causa de incapacidade e a segunda de morte no mundo. De acordo com recentes informações da American Heart Association, em média, a cada 3 minutos e 17 segundos, uma pessoa morre por causa do AVE no mundo, sendo que nos Estados Unidos da América (EUA), a taxa é de 1 morte a cada 21 habitantes. Quando considerado separadamente de outras doenças cardiovasculares, o acidente vascular encefálico ocupa o quinto lugar entre todas as causas de morte, atrás de doenças do coração, câncer, COVID-19, e lesões/acidentes não intencionais. Aproximadamente 67% das mortes ocorreram fora de um hospital de cuidados intensivos, sendo que mais mulheres do que homens morrem a cada ano, devido à maior prevalência de mulheres idosas em comparação com os homens. (TSAO et al., 2023).

Em torno de 5% a 10% dos acidentes vasculares encefálicos (AVEs) ocorre em indivíduos de 18 a 45 anos de idade. Com base em dados agrupados de vários grandes estudos, a probabilidade de morte dentro de 1 ou 5 anos após um acidente vascular cerebral foi maior em indivíduos ≥ 75 anos de idade. Pacientes que sofreram da doença apresentam risco aumentado de depressão. Aproximadamente um terço dos sobreviventes desenvolve depressão pós-AVE, e a frequência é mais alta no primeiro ano após o acidente (TOWFIGHI et al., 2017). O suicídio também aumenta após o AVE (HARNOD; LIN; KAO, 2018).

Em 2020, o número de mortes atribuídas ao AVE foi de aproximadamente 7.08 milhões, demonstrando um aumento de 15,27% em relação a 2010. O número de mortes atribuídas ao AVC isquêmico foi de 3,48 milhões, enquanto à intracerebral hemorrágica foi de 3,25 milhões e à subaracnoide de 0,35 milhões. Entre 2018 e 2019, \$56,5 bilhões de dólares foram gastos direta e indiretamente com cuidados com pacientes nos EUA (TSAO et al., 2023).

Os dados epidemiológicos no Brasil acompanham os elevados números mundiais. Segundo o Sistema de Informações sobre Mortalidade, do Ministério da Saúde (DATASUS), foram contabilizados em média 99 mil óbitos por ano em consequência do AVE, e a cada 2 minutos, uma pessoa é acometida pela doença (THAYABARANATHAN et al., 2022). Corroborando com os dados mundiais apresentados acima, há maior incidência em mulheres, quando comparadas com os homens.

Em relação aos custos despendidos pelo governo, por meio do Sistema Único de Saúde (SUS), foram gastos no ano de 2011, 200 milhões de reais em internações, não sendo contabilizados neste número os custos com tratamento e acompanhamento dos pacientes (THAYABARANATHAN et al., 2022).

1.2.2 Fisiologia do AVE

O AVE é uma condição patológica que ocorre quando há diminuição do fluxo sanguíneo em uma parte do tecido cerebral, com consequente interrupção do aporte de glicose, nutrientes e oxigênio para as células próximas e redução para as células mais distantes (DIRNAGL; IADECOLA; MOSKOWITZ, 1999).

Após um insulto, pode ocorrer a reperusão, em que o fluxo sanguíneo é restituído e o tecido reoxigenado, causando morte excessiva das células (ELTZSCHIG; ECKLE, 2011). O local onde há parada do aporte sanguíneo e ocorre morte celular por necrose é chamado de core e a área onde há diminuição do aporte e morte por apoptose ao longo do tempo, após o insulto, e que ainda pode ser salva é chamada de penumbra (DIRNAGL; IADECOLA; MOSKOWITZ, 1999).

Essa condição pode ser dividida em dois tipos: isquêmica e hemorrágica (Figura 2). A primeira é um dano cerebral causado quando o vaso é bloqueado por um coágulo, agregação plaquetária ou aterosclerose, interrompendo o fluxo sanguíneo e mantendo sintomas neurológicos por mais de 24 horas. Enquanto o ataque isquêmico transiente (TIA) dura menos de 24 horas (SACCO et al., 2006), o segundo pode ser dividido em intracerebral (mais comum), quando um vaso frágil se rompe e há extravasamento do sangue para o parênquima, e subaracnoide, normalmente causada por hipertensão (MAYER; RINCON, 2005; RAFII; HILLIS, 2006).

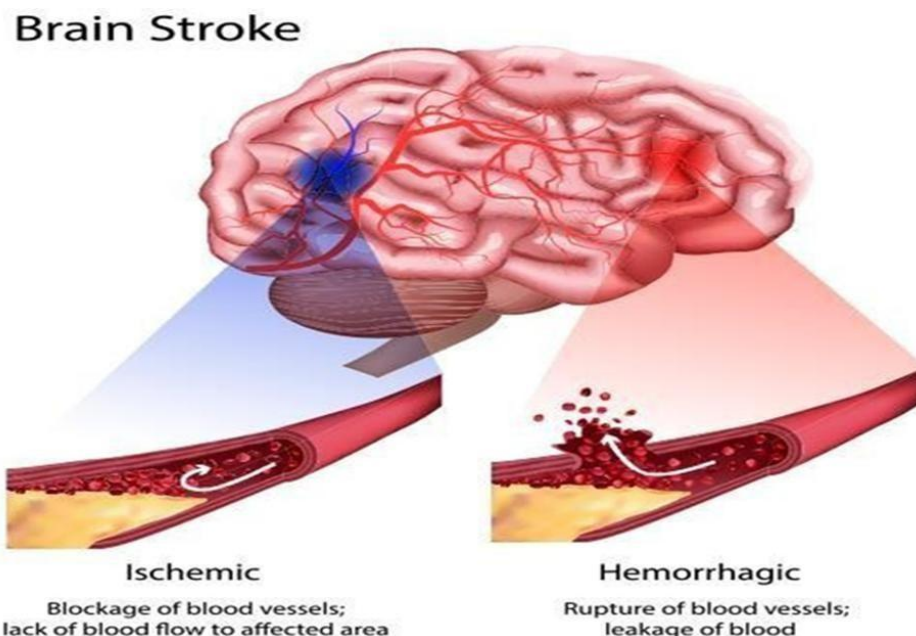


Figura 2: Representação do processo isquêmico e hemorrágico. Durante o processo isquêmico o vaso é bloqueado e o fluxo sanguíneo é cessado. No processo hemorrágico o vaso enfraquecido se rompe e há extravasamento do sangue para o parênquima. [Disponível em: <https://www.neuroskills.com/brain-injury/stroke/what-is-stroke/>]. Acesso em: 18 de agosto de 2024.

Diversos fatores podem contribuir para o aumento do risco de uma isquemia, como pressão alta e distúrbios no ritmo cardíaco (determinantes fortes), diabetes mellitus, fumo, falta de boa alimentação, histórico familiar, genética e problemas renais. Existe um teste que pode ser feito com o objetivo de saber rapidamente quando uma pessoa está sofrendo um AVE chamado FAST (Face, Arm, Speech e Time) que analisa fraqueza facial, fraqueza dos braços, problemas na fala e tempo (ser rápido para ligar para a emergência); além destes sintomas, também pode ocorrer visão turva repentinamente, confusão, queda ou dores de cabeça (TSAO et al., 2023).

Com o intuito de entender melhor os mecanismos de um AVE isquêmico, camundongos e ratos são os modelos mais utilizados, mas coelhos e primatas também são opções devido às suas similaridades com os seres humanos (CASALS et al., 2011).

Para melhor entender as consequências de um AVE, é importante saber os mecanismos que levam as células à morte e as consequências para os seres afetados.

1.2.3 Acidente Vascular Encefálico isquêmico

Após o bloqueio de um vaso no SNC, uma cascata bioquímica começa dando origem aos primeiros sinais de morte celular. A interrupção do suprimento de oxigênio e glicose desencadeia falta de produção de ATP (adenosina trifosfato), energia necessária para as células, resultando em falha energética e desbalanceando a homeostasia iônica. Excitotoxicidade, ruptura da membrana celular, dano mitocondrial e no DNA são caminhos deletérios descritos em uma isquemia (Figura 3).

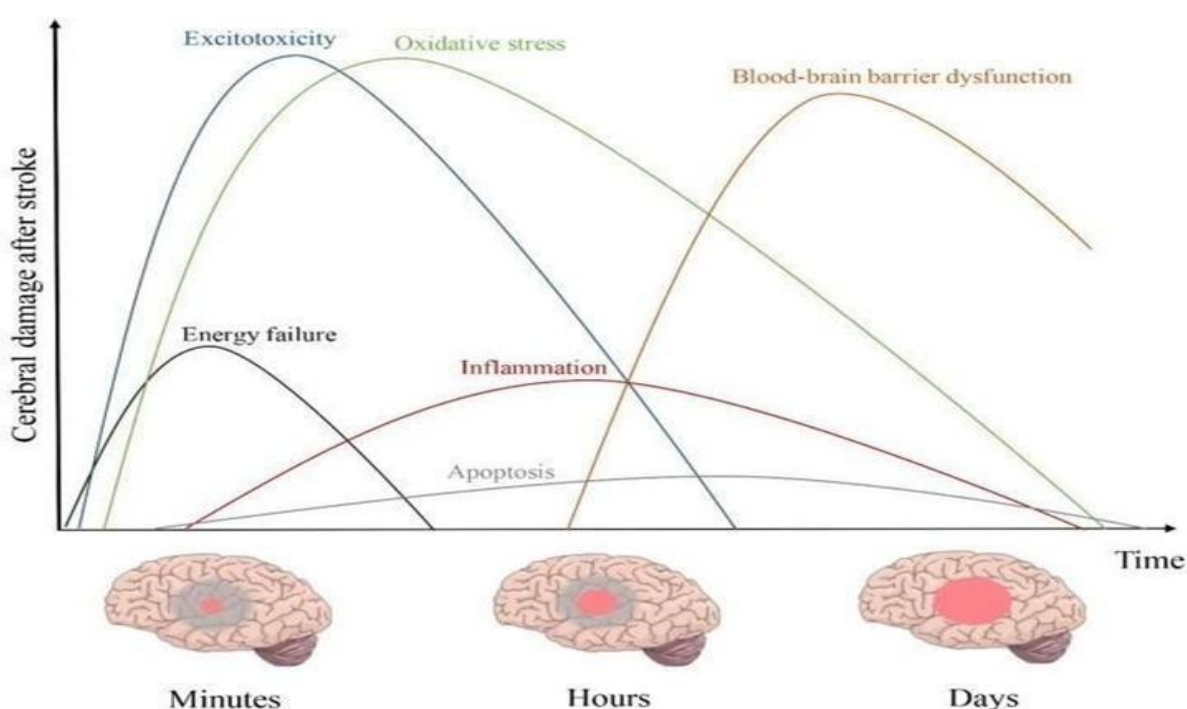


Figura 3: Danos cerebrais causados por um evento isquêmico ao longo do tempo. Logo após a isquemia, há falha energética, ocasionando excitotoxicidade e estresse oxidativo. Nos primeiros minutos, há a formação do core e da penumbra, onde se desenvolve a inflamação e apoptose celular que perduram por horas e até dias. Após algumas horas, a barreira hematoencefálica sofre danos e sua permeabilidade vascular é aumentada, facilitando a entrada de substâncias perigosas no cérebro. Todos os processos deletérios citados podem perdurar por dias, causando cada vez mais danos e morte celular. Adaptado de Bruch et al, 2019.

Após um evento isquêmico, a área danificada revela duas regiões diferentes: o core e a penumbra. A região do core é próxima à parada do fluxo sanguíneo e condensa a maior parte da morte celular. Na penumbra isquêmica, há células danificadas que ainda são viáveis, mas o risco de morte aumenta se a circulação não for rapidamente restaurada (MOSKOWITZ; LO; IADECOLA, 2010).

Quando ocorre a falha energética, o potencial de membrana das células neuronais é comprometido causando despolarização, aumentando o influxo de Ca^{2+}

e Na^+ (DEB; SHARMA; HASSAN, 2010; KATSURA; KRISTIÁN; SIESJÖ, 1994). O aumento do influxo de Ca^{2+} estimula a liberação de aminoácidos excitatórios, como o glutamato, que pode ser encontrado em altos níveis no líquido cérebroespinal (CASTILLO et al., 2016; DÁVALOS et al., 1997). Uma vez liberado, ele liga-se continuamente aos seus receptores ionotrópicos (AMPA, cainato, NMDA) causando aumento do influxo de íons Na^+ , Ca^{2+} e Cl^- ; o que resulta em influxo de água e consequente edema citotóxico (DEB; SHARMA; HASSAN, 2010; DIRNAGL; IADECOLA; MOSKOWITZ, 1999; FURUKAWA et al., 1997; KOSTANDY, 2012).

Transportadores de aminoácidos excitatórios presentes em astrócitos são responsáveis pela recaptura do glutamato, com o objetivo de regular sua concentração na fenda sináptica e não o tornar tóxico para as células neuronais. Entretanto, no decorrer de um evento isquêmico, as células gliais tornam-se reativas, o que dificulta a recaptura do glutamato. Como consequência, o glutamato acumula-se na fenda sináptica causando sobrecarga de Ca^{2+} intracelular e resultando em excitotoxicidade (KOSTANDY, 2012; KYLE; SAHA, 2014). Além disso, os astrócitos também podem desempenhar um papel no evento isquêmico transferindo suas mitocôndrias para o neurônio em sofrimento. Este fenômeno foi recentemente descrito e observado em modelo *in vitro* de co-cultura de astrócitos/neurônios. No entanto, mais estudos precisam ser realizados para melhor entender os mecanismos deste deslocamento mitocondrial (BERRIDGE; SCHNEIDER; MCCONNELL, 2016; HAYAKAWA et al., 2016; VERMEHREN et al., 2018).

A sobrecarga intracelular de Ca^{2+} também resulta na ativação de enzimas proteolíticas e hidrólise de proteínas do citoesqueleto. Fosfolipase A e cicloxigenases induzem produção de radicais livres, incluindo espécies reativas de oxigênio (ERO). O influxo do cálcio aumenta a produção de óxido nítrico pela ativação da NO sintase (GROTTA; HELGASON, 1999), podendo levar à formação de peroxinitrito (ONOO^-), que é altamente tóxico e contribui para danos oxidativos. O começo do dano oxidativo resulta em lipoperoxidação e danos na membrana celular (DIRNAGL; IADECOLA; MOSKOWITZ, 1999) seguido por um decaimento na atividade de enzimas antioxidantes (MILANLIOGLU et al., 2016).

Os radicais livres podem causar dano tecidual, liberação de citocinas pró-inflamatórias, apoptose e cicatrizes gliais (BARRES, 2008; DIRNAGL; IADECOLA; MOSKOWITZ, 1999). O fator de necrose tumoral- α ($\text{TNF-}\alpha$), a proteína C reativa, a

interleucina-1 β (IL-1 β), e IL-6 são citocinas reativas pró-inflamatórias primeiramente ativadas por neurônios, células endoteliais e astrócitos em uma situação isquêmica (DZIEDZIC, 2015; ROTHWELL; HOPKINS, 1995; SINISCALCHI et al., 2014). Esses mediadores inflamatórios podem ativar a micróglia, que pode levar a uma invasão de células inflamatórias pelo sangue (infiltração linfocitária), agravando o tecido já danificado.

A falta da energia e o influxo de Ca²⁺ provocados pela isquemia levam a um prejuízo mitocondrial. A ação contínua do Ca²⁺ desencadeia eventos citoplasmáticos e nucleares, induzindo a formação de ERO's e causando danos na mitocôndria, principalmente no período de reperfusão (DA SILVA et al., 2017). Esta formação e a falta de balanço na produção de NO comprometem a permeabilidade da membrana nuclear, deixando o DNA celular e o mitocondrial vulneráveis (EL ASSAR; ANGULO; RODRÍGUEZ-MAÑAS, 2013; MIKHED; DAIBER; STEVEN, 2015; MÜNDEL et al., 2005).

Todos estes eventos citotóxicos acima afetam a integridade da barreira hematoencefálica (BHE). Esta barreira tem um papel fundamental na regulação do tráfego de fluídos, solutos e células na interface sangue-cérebro e mantém a homeostase deste microambiente (BANKS, 2016; JIANG et al., 2018). A BHE é formada por um conjunto de células epiteliais e endoteliais e um grande número de junções conectando células adjacentes, resultando na diminuição do transporte paracelular (ABBOTT; RÖNNBÄCK; HANSSON, 2006). Esta barreira protege o cérebro contra substâncias consideradas tóxicas e que causariam danos cerebrais (AZAD et al., 2015). Quando em um evento isquêmico ou hemorrágico, ela pode ser danificada, principalmente por lipoperoxidação (radicais livres) que aumenta sua permeabilidade vascular, facilitando a entrada de substâncias perigosas ou terapêuticas no cérebro.

Todo este processo desencadeia a morte celular ao longo das horas e dos dias. As células próximas à área que sofreu o insulto (o core) morrem por necrose, onde o fluxo sanguíneo pode diminuir em até 80%, mas as células mais periféricas ainda estão vivas compondo a penumbra, em que morrem por apoptose, um processo de morte celular programada. Ainda há a possibilidade de se salvar estas células, uma vez que não estão no core (HOSSMANN, 1994) (Figura 4). A via da morte celular é muito estudada por ser uma das últimas envolvidas no processo

isquêmico, definindo o futuro da vida celular. Por esta razão, ela foi uma das vias escolhidas para ser estudada neste trabalho.

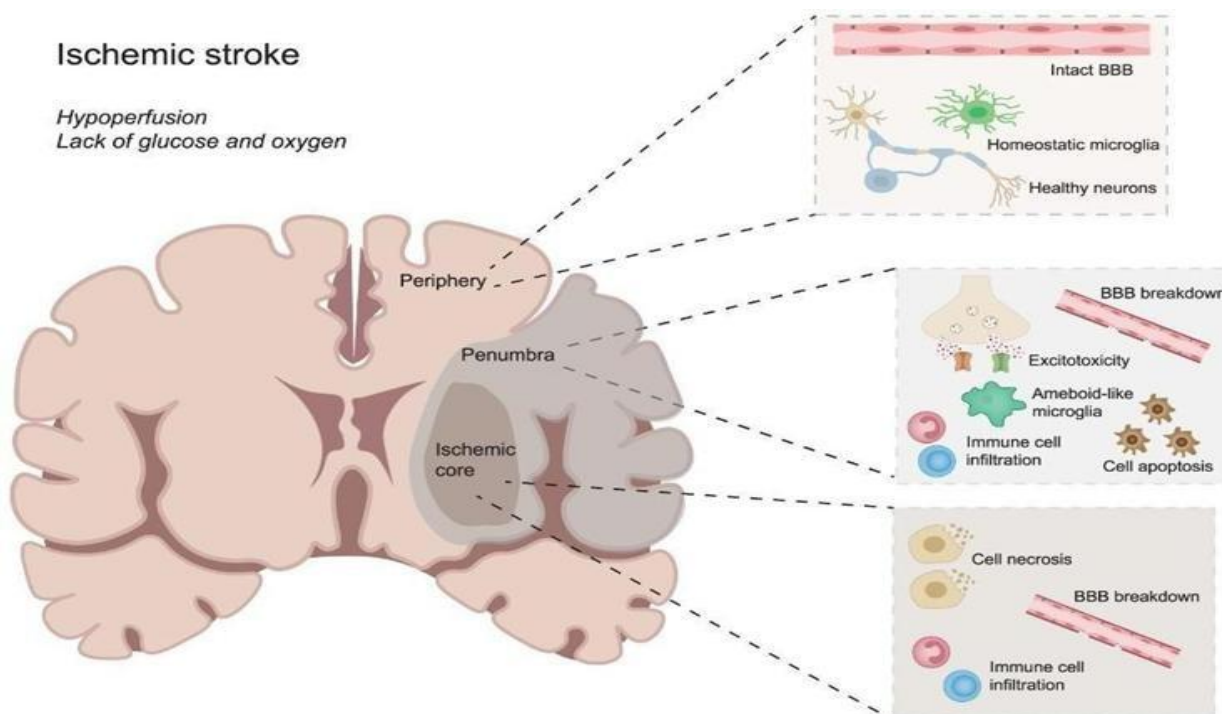


Figura 4: Esquema dos mecanismos fisiopatológicos durante uma isquemia cerebral. Após o evento isquêmico, há falha energética, ocasionando um excesso de entrada de íons Ca^{2+} e Na^+ , causando despolarização celular, com consequente edema.

O influxo de Ca^{2+} aumentado estimula a liberação de glutamato, que não é retirado da fenda sináptica, causando excitotoxicidade, gera indução enzimática, causando degradação da membrana com formação de radicais livres e óxido nítrico, danificando o DNA celular. Com isso, há facilitação da entrada de mediadores inflamatórios, causando ativação microglial e infiltração leucocitária. A entrada de Ca^{2+} citada acima e a formação dos radicais livres também é responsável por danos na mitocôndria ocasionando apoptose. Adaptado de Qin et al., 2022.

1.2.3.1 Morte celular: apoptose celular

1.2.3.1.1 Definição

Os mecanismos de controle celular desempenham uma função importante no desenvolvimento do organismo e na manutenção da integridade dos elementos estruturais. O equilíbrio entre a proliferação e a morte celular representa um aspecto central na regulação e na manutenção da homeostase. Neste contexto, a apoptose

ou programação de morte celular é um mecanismo de morte programada que depende tanto da preexistência, como da síntese de novas proteínas (STELLER, 1995; THOMPSON, 1995; WILLIAMS; SMITH, 1993).

Alterações na regulação da apoptose podem ser uma importante forma de morte celular em doenças crônicas degenerativas como: Alzheimer, Parkinson, Huntington e na degeneração neuronal após lesão cerebral isquêmica (DONG et al., 2020b; HYEON et al., 2021; NAZARIAN et al., 2020; PANAHAZADEH; MIRNASURI; RAHMATI, 2022). Na lesão cerebral isquêmica, tem sido observada a participação de processos apoptóticos na evolução da zona de penumbra para a necrose tecidual (CASTELLANOS et al., 2002).

Foi em 1972 que o termo apoptose foi cunhado por Kerr (KERR; WYLLIE; CURRIE, 1972), para descrever a morte celular que envolve <dispersas e discretas células>. Este fenômeno foi estudado em detalhes ao nível molecular, no *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*, um nematódeo popularmente conhecido como lombriga). No *C. elegans* a morte celular programada é afetada por uma ação sequencial de proteases denominadas CED-3, CED-4 e CED-9 (codificadas pelos genes CED-3, CED-4 e CED-9) (LOVE, 2003).

A apoptose acontece em uma sequência organizada de eventos, sendo iniciada por uma via de sinalização tanto extrínseca, mediada por receptores, quanto intrínseca, mediada pela mitocôndria, estando ambos os processos associados à atividade proteolítica e/ou nucleolítica (ANKARCRONA et al., 1995; LOSSI, 2022). O processo encerra-se com eventos morfológicos distintos, com a condensação nuclear e citoplasmática, seguida da fragmentação da membrana, gerando corpos apoptóticos, que são fagocitados pelas células vizinhas ou macrófagos (BURSCH; OBERHAMMER; SCHULTE-HERMANN, 1992; ORRENIUS; ZHIVOTOVSKY; NICOTERA, 2003; THOMPSON, 1995). Diversas moléculas fazem parte deste processo, como, por exemplo, as caspases.

1.2.3.1.2 Caspases

Caspases (*cysteine-aspartic-acid-proteases*) fazem parte de um grupo de proteases baseadas em cisteína, ou seja, enzimas com um resíduo de cisteína capaz de clivar outras proteínas, após um resíduo de ácido aspártico. Esta característica garante especificidade entre as proteases (AVRUTSKY; TROY, 2021; THORNBERRY; LAZEBNIK, 1998). O papel das caspases na apoptose veio com a

descoberta de que o CED-3, produto do gene requerido para morte celular no *C. Elegans*, está relacionado com a interleucina-1 β , enzima conversora, nos mamíferos (ICE ou caspase-1) (THORNBERRY et al., 1992; YUAN et al., 1993).

As caspases são expressas como pró enzimas (30 a 50 kD), que contém três domínios: um domínio amino-terminal, uma subunidade larga (20kD) e uma subunidade curta (10kD). Sua ativação envolve o processamento proteolítico entre os domínios, seguido pela associação da larga com a curta subunidade, para a formação de um heterodímero. Estruturas cristalinas de duas caspases ativas têm sido determinadas (caspase-1 e -3) e, em ambos os casos, dois heterodímeros associam-se para formar um tetrâmero, com dois sítios catalíticos que parecem funcionar independentemente (ROTONDA et al., 1996; WALKER et al., 1994; WILSON et al., 1994). Dentro de cada domínio catalítico, as subunidades, grande e pequena, estão intimamente associadas, tanto para a ligação a substratos, como para a catálise. De forma geral, as características estruturais das caspases permitem que possam ser ativadas tanto auto cataliticamente, quanto por uma cascata de enzimas com especificidade semelhante (THORNBERRY; LAZEBNIK, 1998). As caspases são categorizadas em caspases iniciadoras (como caspase-8, -9 e -10) e caspases executoras (como caspase-3, -6 e -7). As caspases iniciadoras são responsáveis por desencadear a cascata apoptótica, clivando e ativando as caspases executoras, que por sua vez clivam uma ampla gama de proteínas celulares, levando ao desmantelamento irreversível da célula. Sendo assim, elas apresentam tanto uma função efetora, quanto ativadora, compartilhando similaridades na sequência de aminoácidos, estrutura e especificidade a substratos (NICHOLSON; THORNBERRY, 1997).

1.2.3.1.3 Vias intrínseca e extrínseca

O processo de apoptose envolve a ativação de caspases por meio de vários mecanismos, levando à clivagem de substratos celulares específicos, como proteínas estruturais, enzimas de reparo de DNA e moléculas de sinalização. Isto resulta nas alterações morfológicas e bioquímicas características observadas nas células apoptóticas, incluindo condensação da cromatina, fragmentação do DNA, formação de bolhas na membrana e formação de corpos apoptóticos (UZDENSKY, 2019).

As vias intrínsecas e extrínsecas da apoptose são processos fundamentais que regulam a morte celular programada, desempenhando papéis fundamentais em vários contextos fisiológicos e patológicos. Essas vias ativam cascatas de sinalização distintas, levando à eliminação controlada de células. Compreender as diferenças e mecanismos dessas vias é crucial para compreender a intrincada regulação do destino celular (DATTA et al., 2020; RADAK et al., 2017).

1.2.3.1.4 Via intrínseca

A via intrínseca, também conhecida como via mitocondrial, é iniciada a partir de dentro da célula em resposta a estressores celulares internos, como danos ao DNA, hipóxia ou falta de sinais de sobrevivência. Esta via envolve a perturbação da membrana mitocondrial, levando à liberação do citocromo C no citoplasma. O citocromo C então forma um complexo com o fator 1 de ativação da protease apoptótica (APAF1) e a procaspase-9, resultando na ativação da caspase-9. Posteriormente, a caspase-9 cliva e ativa caspases executoras (por exemplo, caspase-3, -6, -7), levando em última análise à apoptose celular (GONG et al., 2024) (Figura 5).

1.2.3.1.5 Via Extrínseca

Em contraste, a via extrínseca é desencadeada por sinais externos de outras células ou do ambiente extracelular. Esta via é iniciada pela ligação de ligantes de morte extracelular (por exemplo, ligante Fas, TNF- α) a receptores de morte (por exemplo, Fas, receptor de TNF), levando ao recrutamento e ativação de caspases iniciadoras, particularmente caspase-8 e caspase-10. A caspase-8 ativada pode iniciar diretamente a apoptose pela clivagem e ativação de caspases executoras, ou pode ativar a via intrínseca por meio da clivagem de Bid (Agonista de Morte do Domínio de Interação BH3), levando à disfunção mitocondrial e subsequente ativação da via intrínseca (MAO et al., 2022) (Figura 5).

1.2.3.1.6 Caspases na isquemia cerebral

Durante a isquemia cerebral, como dito anteriormente, o processo de apoptose inicia-se principalmente na região da penumbra, sendo considerada uma área possível de salvamento. Diversos estudos foram desenvolvidos com o interesse

de encontrar uma maneira de neuroproteger o tecido cerebral dos mecanismos deletérios. Li e colaboradores (2023) observaram que a oridonina, um composto diterpenóide natural extraído da erva chinesa *Rabdosia rubescens*, tem ação antiapoptótica dependente da via de RIPK3, em modelos *in vitro* e *in vivo* de isquemia cerebral em camundongos machos C57/Bl6, demonstrando ação neuroprotetora (LI et al., 2023). Assim como a oridonina, outro extrato natural também apresentou resultados positivos na neuroproteção da isquemia cerebral. Li e colaboradores (2021) observaram que o extrato da folha de *Ginkgo biloba* L. inibe a apoptose de neurônios hipocámpais em camundongos machos C57/Bl6 submetidos à oclusão da artéria cerebral média (MCAo), um modelo isquêmico. Foi observado que esta neuroproteção ocorreu pela regulação da via de Bax/Bcl-2 e caspase-3 (LI et al., 2021).

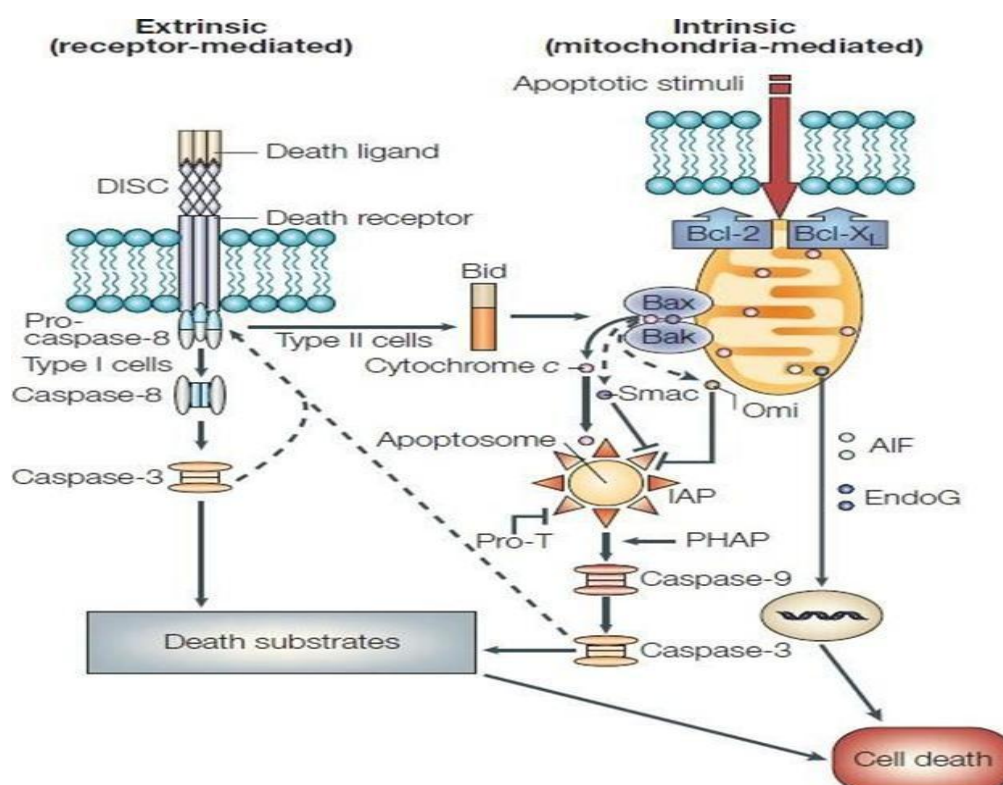


Figura 5: Vias apoptóticas – Extrínseca e Intrínseca. A via extrínseca é modulada a partir da ligação de um ligante de morte ao seu respectivo receptor, com formação do complexo de ativação e consequente ativação de caspase-8, que posteriormente ativa de caspase-3. A via intrínseca é modulada por estímulos apoptóticos que culminam com a ativação de proteínas da família Bcl-2 e consequente abertura dos poros mitocondriais. Segue-se a liberação do citocromo C e formação do complexo de ativação apoptossoma, juntamente com a ligação com procaspase-9 e apaf-1, com posterior ativação de caspase-9 e consequente ativação de caspase-3. AIF e EndoG são liberados a partir dos poros mitocondriais, translocando-se diretamente para o núcleo (Adaptado de: Orrenius, Zhivotovsky et al., 2003).

Assim como produtos naturais, os fatores neurotróficos e lectinas também agem neuroprotegendo os animais da isquemia cerebral. Wesley e colaboradores (2020) observaram que a galectina-3, da família de lectinas com carboidrato β -galactosídeo, administrada intracerebralmente, promoveu neuro angiogênese, inibindo a apoptose e regulando a via Akt/caspase em ratos SHR machos submetidos à MCAo (WESLEY et al., 2021). Também em ratos Sprague-Dawley machos, foi observada neuroproteção a partir da ação do fator neurotrófico neuritina. Neste estudo, a administração intraperitoneal e intraventricular proporcionou inibição de apoptose neuronal e inflamação NLRP3 (XU et al., 2023a).

Como pode ser observado, diversos estudos demonstraram ação protetora em modelos de isquemia *in vitro* e *in vivo*. Importante ressaltar que a via de administração mais utilizada nestes casos foi a intraestrutural, uma vez que permite uma entrega mais eficaz de agentes terapêuticos ao SNC. A administração direta de medicamentos no cérebro fornece uma abordagem mais imediata e direcionada para o tratamento de condições neurológicas (BANKS, 2016). Este método pode levar a um início mais rápido dos efeitos terapêuticos, biodisponibilidade superior e aumento da disponibilidade de medicamentos no SNC devido ao desvio da barreira hematoencefálica (BHE). Além disso, a administração direta pode potencialmente eliminar a necessidade de modificar a droga original para facilitar a sua entrega ao alvo, preservando assim, as propriedades farmacológicas originais do medicamento, minimizando os efeitos colaterais sistêmicos (WU et al., 2023).

Outro benefício é a possibilidade de contornar a barreira hematoencefálica, uma membrana altamente seletiva que regula a passagem de substâncias da corrente sanguínea para o cérebro. Ao administrar medicamentos diretamente no cérebro, é possível contornar as limitações por ela impostas, permitindo uma entrega mais eficaz de agentes terapêuticos ao SNC (TERSTAPPEN et al., 2021).

Porém, mesmo citando todos esses benefícios de uma administração intracerebral, quando translacionamos para um estudo e posterior administração em humanos, essa via torna-se de última escolha, sendo escolhidas vias menos invasivas e mais confortáveis, como a intraperitoneal, intramuscular e intravenosa (HERSH; ALOMARI; TYLER, 2022). Tendo o foco nestas últimas vias de administração, surge um obstáculo biológico extremamente importante, a barreira hematoencefálica (BHE).

1.3 Barreira Hematoencefálica

A BHE é uma interface altamente seletiva entre o sangue e o cérebro que desempenha um papel essencial na manutenção de um ambiente ideal para o funcionamento e a homeostase do SNC. Sem a BHE, o SNC corre o risco de invasão de toxinas, patógenos, células imunológicas ou desregulação iônica, o que levaria à disfunção e degeneração neuronal (DANEMAN; PRAT, 2015). A função da BHE emerge de uma associação de células cerebrais, incluindo células endoteliais cerebrais, células murais (pericitos e células musculares lisas vasculares), astrócitos, neurônios, micróglia e uma membrana basal, que é conhecida como unidade neurovascular (UNV) (IADECOLA, 2017). A comunicação constante entre essas células ajuda a refinar as funções da BHE de modo a atender às necessidades do cérebro e ainda facilitar a interação entre o cérebro e o resto do organismo (BANKS, 2016).

O conceito de unidade neurovascular ajuda na compreensão da BHE e suas funções. Ela consiste nas células endoteliais e em todas as células que interagem com elas (HAWKINS; DAVIS, 2005). Uma BHE saudável e funcional implica que todos esses componentes estão interagindo corretamente. Junções estreitas complexas entre as células endoteliais do cérebro selam o espaço paracelular formando uma barreira contínua, enquanto os astrócitos, pericitos e a membrana basal circundam as células endoteliais (DONG, 2018).

As células endoteliais são consideradas a estrutura anatômica central da BHE para revestir os vasos sanguíneos cerebrais e interagir com diferentes tipos de células no SNC (ZHANG et al., 2016). As células endoteliais na BHE diferem das células endoteliais periféricas em morfologia e função (REESE; KARNOVSKY, 1967; WESTERGAARD; BRIGHTMAN, 1973), o desempenho da barreira não é uma propriedade inata das células endoteliais (LANGEN; AYLOO; GU, 2019). Para a morfologia, as células endoteliais na BHE são fixadas por junções estreitas e junções aderentes, resultando em compartimentos distintos da membrana luminal e abluminal. Eles ainda se apresentam sem fenestrações, também conhecidas como pequenos poros transcelulares, que limitam bastante a difusão livre e a rápida troca de moléculas entre o tecido cerebral e o sangue (ALHADIDI; BIN SAYEED; SHAH, 2017). Além disso, as quantidades de mitocôndrias nas células endoteliais da BHE

são maiores do que nas células endoteliais periféricas, o que significa que mais energia é necessária para o transporte (LI et al., 2022).

Os astrócitos são células da glia que ajudam no suporte e proteção de neurônios, regulando a concentração de neurotransmissores e de íons, mantendo a homeostase neuronal, eliminando resíduos, ajustando o fluxo sanguíneo cerebral, regulando a função vascular, hemostasia e equilibrando as respostas neuroimunes (AHMADPOUR; KANTROO; STOBART, 2021; RODRÍGUEZ-ARELLANO et al., 2016; ZHAO et al., 2022). Além disso, astrócitos também são capazes de interagir com células endoteliais por meio de suas projeções finais que circundam os capilares cerebrais (ABBOTT; RÖNNBÄCK; HANSSON, 2006; MCCONNELL; MISHRA, 2022). Os astrócitos ainda apresentam papel importante no suporte da integridade da BHE. Estudos demonstraram que moléculas efetoras como o colesterol e a apolipoproteína E, eliminadas por astrócitos, têm como função aumentar e manter a impermeabilidade da barreira (KEANEY; CAMPBELL, 2015).

Os pericitos são células perivasculares que estão envolvidos na regulação do fluxo sanguíneo capilar, no diâmetro capilar, na angiogênese e na manutenção da integridade da parede capilar (WINKLER; BELL; ZLOKOVIC, 2011). Estudos apontam os pericitos como contribuintes essenciais para a formação e função da BHE tanto na fase adulta, como na infância (KEANEY; CAMPBELL, 2015).

A micróglia, como célula imunológica residente do SNC, desempenha um papel vital na regulação e manutenção da BHE. Diante de uma situação patológica como a isquemia, que apresenta fases de inflamação, ela pode se apresentar de maneiras diferentes. Uma é o estado pró-inflamatório, sendo responsável pela liberação de citocinas pró-inflamatórias, piorando o quadro inflamatório e podendo levar a danos no tecido cerebral. O outro é o estado anti-inflamatório, em que libera fatores que contribuem na recuperação tecidual após inflamação (WU et al., 2023) (Figura 6).

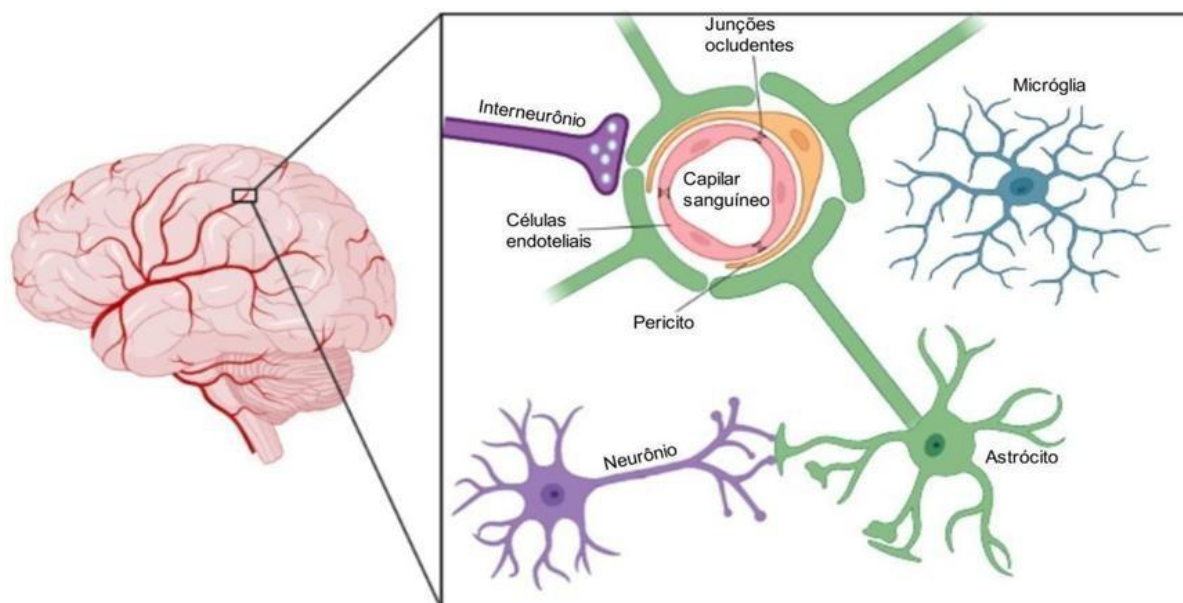


Figura 6: Imagem esquemática da barreira hematoencefálica. A BHE é composta por importantes componentes: células endoteliais com suas junções aderentes, circundadas pelo pericito e pelos astrócitos, e micróglia que desempenham papéis fundamentais para a homeostase e sobrevivência das células neuronais. Adaptado de FERNANDES, L.F. (2022). *Uso de lipossomos com angiotensina-(1-7) para o tratamento de acidente vascular encefálico*. Tese de doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. Figura 3, p. 31.

A presença de BHE evita danos ao cérebro, mantendo um ambiente estável (CAI et al., 2018; HARATI et al., 2012). Porém, ao mesmo tempo, limita que drogas e fármacos entrem no SNC para o tratamento de doenças cerebrais, como doenças neurodegenerativas, câncer cerebral e o foco do nosso estudo, a isquemia cerebral (SARAIVA et al., 2016).

Nos últimos anos, a BHE vem sendo muito estudada com o objetivo de desenvolver estratégias para passagem de medicamentos e drogas para o SNC. Essa preocupação ocorre pois, quando administrados pelo sistema periférico, muitos medicamentos têm baixa biodisponibilidade no cérebro devido à sua incapacidade de atravessar a BHE de forma eficiente, resultando em efeitos terapêuticos abaixo do ideal (TERSTAPPEN et al., 2021).

Certas propriedades do fármaco, como lipofilicidade, alta ligação às proteínas e suscetibilidade à cristalização, podem representar desafios para uma administração cerebral eficaz. Essas características podem impactar a absorção, distribuição e biodisponibilidade de medicamentos no cérebro. Muitos destes são facilmente degradados por sistemas biológicos (CORREIA et al., 2022).

Um deles é a metabolização no fígado e a degradação no trato gastrointestinal (TGI). O fígado desempenha um papel crucial na metabolização de

medicamentos, onde as enzimas hepáticas realizam transformações químicas nos fármacos, muitas vezes inativando-os ou convertendo-os em metabólitos que podem ser excretados pelo organismo. Além disso, o ambiente ácido do estômago pode degradar certos medicamentos antes que eles tenham a oportunidade de serem absorvidos e alcancarem a corrente sanguínea, o que também impede sua passagem para a BHE (FARKOUH et al., 2020).

Quando os medicamentos são administrados, eles entram em contato com enzimas do organismo que são capazes de alterar sua estrutura química por meio de reações metabólicas. Esta transformação metabólica pode levar à inativação ou modificação dos fármacos, afetando a sua atividade farmacológica e o potencial de atravessar barreiras fisiológicas, como a barreira hematoencefálica (FARKOUH et al., 2020).

O metabolismo desempenha um papel crucial na determinação do destino dos medicamentos no organismo, pois pode levar à formação de metabólitos que podem apresentar propriedades farmacológicas diferentes em comparação com o medicamento original. Compreender as vias metabólicas dos medicamentos é essencial para prever a sua estabilidade, biodisponibilidade e potencial para atingir o sistema nervoso central (VAN DEN ANKER et al., 2018).

Com isso, estratégias foram sendo estudadas ao longo dos anos para que os medicamentos pudessem passar a BHE e agir de maneira eficaz no cérebro, os chamados nanocarreadores.

1.4 Tratamentos existentes para o AVE

Atualmente, somente alguns procedimentos são normalmente ofertados para melhorar a qualidade de vida do paciente acometido pelo AVE. Não há tratamento efetivo para o AVE isquêmico, onde somente duas medidas são adotadas.

As medidas aprovadas são a trombólise e a trombectomia, sendo as principais forma de cuidado para o insulto isquêmico e únicas aprovadas pela FDA (Food and Drug Administration). A trombólise consta da intervenção farmacológica utilizando um ativador de plasminogênio tecidual, também chamado de t-Pa (CHEN; GAO, 2017). Ele consegue dissolver o coágulo dos vasos cerebrais, restaurando, assim, o fluxo sanguíneo, e resultando em proteção para o tecido cerebral isquemiado. Entretanto, este tratamento apresenta uma janela terapêutica eficaz muito limitada (4-5 horas após o insulto) e é a principal razão pela qual somente 7%

dos pacientes elegíveis podem se beneficiar deste tratamento; além disso, há um aumento do risco de hemorragia intracerebral (CHEN; GAO, 2017; POWERS et al., 2018).

A trombectomia, por outro lado, é um processo cirúrgico que recupera mecanicamente o fluxo sanguíneo de artérias de grande calibre promovendo maior efeito de recanalização que a trombólise (CHAMORRO et al., 2016). Mesmo este procedimento mecânico apresentando mais vantagens que o farmacológico sozinho, infelizmente, não está disponível em todos os hospitais, reduzindo bastante a quantidade de pacientes que poderiam se beneficiar com o tratamento endovascular da trombectomia (HANKEY, 2017). Além disso, mesmo quando o processo é um sucesso instalando a perfusão, ainda há possibilidade de os pacientes apresentarem sequelas que prejudicam a qualidade de vida, devido à própria perfusão instalada gerar espécies reativas de oxigênio (ERO) e dano tecidual (MANZANERO; SANTRO; ARUMUGAM, 2013).

Considerando as escassas possibilidades de tratamento para os pacientes, muitos estudos vêm sendo realizados com o intuito de descobrir substâncias que possam ser neuroprotetoras durante um evento isquêmico, ou seja, que possam intervir nos mecanismos descritos acima e outros que desencadeiam a morte neuronal e consequentemente incapacitam grande parte dos pacientes, levando à morte em alguns casos. Além disso, há o desenvolvimento de nanocarreadores para a entrega de fármacos que são rapidamente degradados pelo organismo quando em estado livre.

1.5 Nanocarreadores

Nanocarreadores, como nanopartículas metálicas e lipossomas, desempenham um papel fundamental na facilitação da entrega de medicamentos ao sistema nervoso central. Suas propriedades e design únicos os tornam ferramentas promissoras para superar os desafios associados à entrega de medicamentos ao cérebro.

O nanocarreadores proporcionam proteção contra a degradação de medicamentos, seja encapsulando moléculas, ou as biofuncionalizando com a ligação de compostos à sua superfície. Com isso, aumentam sua estabilidade e preservam sua atividade farmacológica durante o trânsito até o local alvo. Além disso, geram uma maior concentração de drogas nos tecidos-alvo facilitando a

entrega de medicamentos a tecidos específicos e levando a concentrações locais mais elevadas de agentes terapêuticos. Esta abordagem direcionada pode melhorar a eficácia da terapia medicamentosa e, ao mesmo tempo, minimizar os efeitos colaterais sistêmicos (ZHANG; CHEN; CHEN, 2024).

Ao permitir a entrega direcionada, os nanocarreadores podem minimizar os efeitos fora do alvo em tecidos saudáveis, reduzindo os efeitos colaterais tóxicos associados à administração convencional e não invasiva de medicamentos. Estratégias de modificação de nanomateriais, por exemplo, estão sendo desenvolvidas para gerar uma especificidade aprimorada para tecidos-alvo. Os nanocarreadores podem ser modificados com ligantes específicos para aumentar sua especificidade para tecidos-alvo, permitindo a entrega precisa e seletiva dos medicamentos (ZHANG et al., 2022).

Quando o medicamento ou droga apresenta características que os tornam não biocompatíveis com o organismo, como pouca solubilidade em água, facilidade de degradação ou baixa tempo de meia-vida, os nanocarreadores podem aumentar sua biodisponibilidade, melhorando a biodistribuição dos medicamentos (ACHAR; MYERS; GHOSH, 2021).

Outra vantagem da utilização dos nanocarreadores é a entrega controlada de medicamentos, como as nanopartículas lipídicas sólidas (SLNs), que permitem liberação sustentada e maior eficácia do tratamento. Em resumo, os nanocarreadores fornecem uma plataforma versátil e eficaz para a entrega de medicamentos, oferecendo vantagens como proteção contra degradação, entrega direcionada, redução de efeitos colaterais e melhor biodisponibilidade de medicamentos (SATAPATHY et al., 2021).

No caso dos estudos envolvendo o uso de nanocarreadores para o tratamento da isquemia cerebral, há uma grande utilização de lipossomas e nanopartículas lipídicas (ZHANG; CHEN; CHEN, 2024). Song e colaboradores (2023) desenvolveram uma nanopartícula de PLGA em forma de bastão carregada com piceatanol para intervenção direcionada nas interações neutrófilos-células endoteliais em um modelo de oclusão da artéria cerebral média (MCAo). Eles se inspiraram no fato de que os neutrófilos exibem uma preferência pela fagocitose de partículas alongadas e que o PLGA em forma de bastão é facilmente fagocitado pelos neutrófilos. Com isso, eles observaram liberação do piceatanol na região isquêmica e consequente inibição microglial e inflamatória (SONG et al., 2023).

A curcumina é conhecida por seus efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes, mas sua fraca hidrofiliabilidade e a instabilidade química tornam sua aplicação desafiadora (ZHANG et al., 2023). Wang e colaboradores usaram um copolímero anfifílico constituído de polietilenoglicol (PEG) e poli (ácido láctico) (PLA) para preparar a curcumina encapsulada a uma nanopartícula, o que melhora a estabilidade da curcumina na circulação sanguínea em um modelo de isquemia/reperfusão em cultura primária de células endoteliais. Eles observaram diminuição da ativação de micróglia e de fatores pró-inflamatórios (ZHANG et al., 2023).

O uso de lipossomas também ganhou bastante notoriedade, por serem compostos por uma bicamada lipídica e um compartimento interno aquoso, podendo encapsular compostos hidrofílicos ou lipofílicos, possibilitando a utilização da maioria dos fármacos (BRUCH et al., 2019). Zhao e colaboradores (2018) investigaram os efeitos do licopeno (LYC) na forma de nano-lipossomas (L-LYC) em proteínas reguladoras de ferro e lesão cerebral isquêmica *in vivo* em ratos Sprague-Dawley. Eles descobriram que o L-LYC aumentou significativamente o conteúdo de licopeno no soro e no cérebro, melhorando o metabolismo de ferro e gerando neuroproteção neuronal (ZHAO et al., 2018).

Dentre todas essas nanopartículas, um grupo se destaca por suas propriedades físico-químicas únicas: as nanopartículas inorgânicas. Elas são caracterizadas por uma estrutura controlável, superfície modificável e alta eficiência de carregamento, apresentando grande valor de pesquisa no tratamento e diagnóstico de diversas doenças (BIGHAM; WILSON, 2023; GINER-CASARES et al., 2016; ZHANG et al., 2021). Dentre esse grupo de nanocompostos, há anos vem se estudando cada vez mais as nanopartículas formadas pelo ouro (AuNPs), foco deste trabalho. Neste cenário, desde alguns anos atrás, as nanoesferas de ouro, mais especificamente, vêm demonstrando diversas ações promissoras para o tratamento da isquemia cerebral.

1.6 Nanoesferas de ouro e seus usos

Os nanomateriais à base ouro são sintetizados a partir do ácido cloroáurico, HAuCl_4 , podendo ser formados diversos formatos de partículas, dependendo de sua rota de síntese, como por exemplo, os nanorods, nanoshells e nanoclusters (Figura 7). Neste trabalho, foram estudadas as nanoesferas de ouro que apresentam

características físico-químicas e ópticas bastante únicas, tornando-as plataformas extremamente versáteis, podendo ser utilizadas para sensoriamento, imageamento, diagnóstico, terapias e sistemas de transportes para entrega de drogas órgão-específico (BINDHU; UMADEVI, 2014; GARCIA-ETXARRI; YUSTE, 2021; MIESZAWSKA et al., 2013; SHARIFI et al., 2019). Diversas de suas propriedades promissoras agregam valor para sua utilização em modelos biológicos e diversas escolhas têm que ser feitas para obter o melhor tipo de nanomaterial para o objetivo do estudo, como a rota de síntese, a forma, a carga, o tamanho e a biofuncionalização.

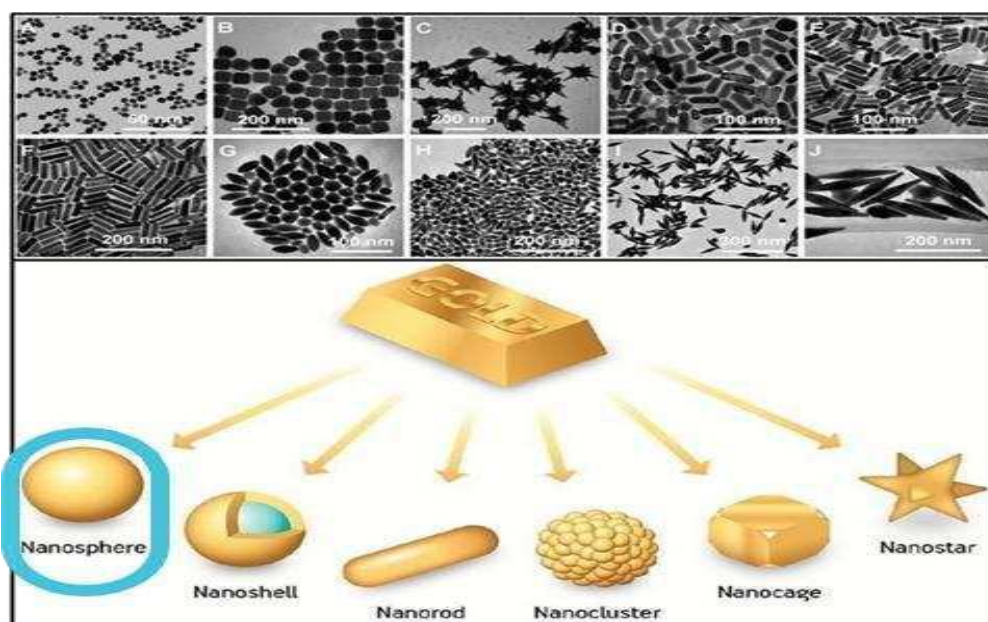


Figura 7: Representação dos diferentes nanomateriais à base de ouro. Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão de AuNPs. (A) Nanosferas. (B) Nanocubos. (C) Nanobrânquios. (D) Nanobastões, (E) Nanobastões, (F) Nanobastões, (G – J) Nanobipirâmides de tamanhos diferentes (Parte Superior). Montagens e morfologias modeladas de alguns AuNPs populares (Parte Inferior). Adaptado de Sarfraz et al, 2021.

1.6.1 Nanoesferas de ouro e seus redutores

Uma das características que chama a atenção é sua diversidade de formação de esferas a partir do uso de diferentes redutores, utilizados para geração, nucleação e multiplicação das partículas. A síntese das nanoesferas é mais simples e barata quando comparada às outras nanopartículas de ouro, principalmente em relação a biofuncionalização de drogas ou substâncias com presença do grupo -SH, ligando-se covalentemente (WU et al., 2014).

Uma das primeiras sínteses foi feita a partir do citrato de sódio, tornando-se uma rota clássica na literatura que ficou conhecida como o método de Turkevich (DONG et al., 2020a; TURKEVICH; STEVENSON; HILLIER, 1951). Nesta síntese, as esferas tomaram forma a partir do HAuCl_4 e apresentaram uma gama de tamanhos com aumento do desvio padrão diretamente relacionado ao aumento do tamanho das partículas. Para uma melhor compreensão desta dinâmica, estudos posteriores avaliaram com mais detalhes a importância da estabilidade das soluções e foi descoberto que diversos fatores a influenciam. Dong e colaboradores (2020) repetiram a rota de Turkevich e sintetizaram nanopartículas de 15 nm a 50 nm e perceberam que quanto maiores, menor a estabilidade. Eles discutiram que a vantagem deste método seria a possibilidade de controlar o tamanho das AuNPs mudando a razão molar (RM) entre citrato de sódio e HAuCl_4 . A chave para uma melhor estabilidade estaria na quantidade suficiente de redutor na solução ($\text{RM} > 3$) (DONG et al., 2020a). De acordo com Polte e colaboradores (2015, 2010), um grande número de partículas-semente (~2 nm de raio) foi formado à medida que a supersaturação dos átomos de ouro aumentava rapidamente (POLTE, 2015; POLTE et al., 2010). Se houvesse citrato suficiente na solução ($\text{RM} > 3$), as partículas seriam aproximadamente estabilizadas e o processo de crescimento das AuNPs e o tamanho final das partículas seriam aproximadamente os mesmos, independentemente do excesso molar (WUITHSCHICK et al., 2015). À medida que o MR diminui ($\text{RM} < 3$), teria menos citrato disponível para estabilizar as partículas-sementes. Consequentemente, ocorreria sua agregação, resultando em menos partículas, tamanhos finais de partículas maiores e forma menos esférica.

Ao longo dos anos, foram sendo descobertos novos redutores e assim, sendo desenvolvidas novas rotas com o objetivo de gerar nanoesferas de menores tamanhos e com maior facilidade de ligação de outras substâncias à sua superfície (AMENDOLA et al., 2017; LEE et al., 2020; RATTAN et al., 2021). Com isso, o uso de métodos alternativos cresceu e atualmente são utilizadas uma variedade de plantas, microrganismos e biomoléculas derivadas deles como fonte para a síntese de diversos tipos de nanopartículas.

Extratos de diferentes partes da planta, como folhas, raízes, sementes, flores, frutos, cascas, e microrganismos, incluindo bactérias, fungos e algas, são amplamente usados para as sínteses de diferentes tamanhos e formas por meio de rotas interdisciplinares (SANTHOSH; GENOVA; CHAMATI, 2022). As plantas, por

exemplo, são ricas em alcaloides, flavonoides, saponinas, esteroides, taninos e outros compostos naturais (KUPPUSAMY et al., 2016). O extrato de planta contém vários metabólitos secundários, que atuam como agentes redutores e estabilizadores na biogênese de nanopartículas (AHMED et al., 2016). Islam e colaboradores relataram um método sintético verde e reprodutível para produzir nanopartículas de ouro (AuNPs) altamente estáveis, utilizando o extrato das folhas da planta *Salix alba* L. (salgueiro-branco), que pertence à família Salicaceae. Neste estudo, eles foram capazes de gerar dados dos espectros de absorção UV-Vis que revelaram AuNPs coloidalmente estáveis em diferentes pH e concentrações de sal (ISLAM et al., 2019). Um estudo avaliou a síntese extracelular de AuNPs usando extrato de folha de coentro como agente redutor. De acordo com os achados de imageamento de microscopia eletrônica de transmissão (TEM), houve a formação de AuNPs estáveis na faixa de tamanho de 6,75–57,91 nm, além de poder gerar uma diversificação de formatos, como esféricos, triangulares, triângulos truncados e morfologias decaédricas (NARAYANAN; SAKTHIVEL, 2008).

Também já foram sintetizadas nanopartículas a partir de microrganismos, como as bactérias, fungos e algas, principalmente por seu fácil manuseio e processamento, meio de baixo custo para seu crescimento e capacidade de adsorver e reduzir vários íons metálicos (AKINTELU; YAO; FOLORUNSO, 2021; LEE et al., 2020). Os fungos são excelentes candidatos para a produção em larga escala de nanopartículas devido à simplicidade, alta escalabilidade, processamento downstream, fácil inclusão e eficiência de custo do crescimento tanto em escala laboratorial quanto industrial. Suas paredes celulares possuem diferentes grupos funcionais, como amina, carboxila, sulfidril, hidroxila e fosfato, que atuam como ligantes e ajudam a quelar íons metálicos (DIKSHIT et al., 2021). Recentemente, Nguyen e colaboradores (2022) demonstraram a síntese verde de nanopartículas de prata e ouro usando *Ganoderma lucidum*, extrato de cogumelo, como agente redutor e de proteção. Elas mostraram excelente atividade catalítica, antibacteriana e detecção colorimétrica de íons Fe^{3+} em sistemas hídricos reais e exibiram suas excelentes propriedades em aplicações ambientais e biotecnológicas (NGUYEN et al., 2022). Singh e colaboradores (2019) relataram a síntese de AuNPs usando extrato aquoso de *Dunaliella salina*, uma microalga unicelular e halotolerante. O potencial anticancerígeno das AuNPs foi testado contra a linha celular de câncer de mama (MCF7) e a linha celular epitelial mamária normal (MCF 10A) e os resultados

indicaram que essas AuNPs sintetizadas usando *D. salina* atenuaram seletivamente as células cancerosas e não foram prejudiciais à linha celular normal (SINGH et al., 2019).

As bactérias são boas candidatas para a síntese de AuNPs devido à sua abundância no ambiente, rápido crescimento e capacidade de sobreviver em condições extremas. Diversas de suas enzimas, ácidos graxos e açúcares presentes na célula bacteriana podem reduzir íons metálicos às suas respectivas nanopartículas (GRASSO; ZANE; DRAGONE, 2020). Sathiyarayanan e colaboradores relataram uma síntese extracelular de AuNPs usando *Bacillus megaterium* MSBN04. O exopolissacarídeo (EPS) produzido por essa bactéria atua tanto como agente redutor, quanto estabilizador (SATHIYANARAYANAN et al., 2013). Uma nova cepa de *Marinobacter pelagius* que pertence a bactérias marinhas foi explorada e observou-se que ela é capaz de tolerar alta concentração de sal e evitar a toxicidade de diferentes íons metálicos para a produção de AuNPs. Houve formação de AuNPs estáveis e monodispersos com tamanho em torno de 10 nm após a exposição da solução de ácido cloroáurico às células inteiras. O resultado indicou que esta cepa bacteriana pode sintetizar AuNPs mais estáveis e monodispersas com tamanho em torno de 2–6 nm (SHARMA et al., 2012).

Mesmo o método de Turkevich sendo considerado um dos mais clássicos e populares, ele ainda apresenta algumas limitações, como a dispersão do tamanho das partículas. Por isso, com o tempo e evolução dos métodos de síntese e suas diversidades, um outro redutor chamou atenção por sua facilidade de uso e poder de redução: o borohidreto de sódio (NaBH_4), apresentando resultados melhorados com maior monodispersidade, melhor controle de tamanho e geração de nanopartículas detamanhos ainda mais reduzidos (JINGYUE; BERND, 2015). Alguns estudos utilizam ambos em suas rotas; o NaBH_4 atuando como o redutor e o citrato de sódio, o estabilizante. Com isso, novas rotas foram capazes de gerar nanopartículas ainda menores e mais monodispersas, sendo capazes de chegar a tamanhos de 1nm, as chamadas ultrapequenas (SHAJKUMAR et al., 2017; SIMPSON et al., 2013; SOUSA et al., 2012; WANG et al., 2018). As sínteses a partir do NaBH_4 também geraram a possibilidade da facilitação da ligação de drogas e moléculas à superfície das esferas, uma vez que o citrato age como uma capa protetora dificultando biofuncionalizações.

1.6.2 Glutathiona

Como dito anteriormente, nanoesferas de ouro tem uma facilidade para se ligar a moléculas que apresentam grupos -SH, sendo uma ligação forte, a covalente. Uma molécula que vem ganhando foco de estudos e que apresenta esta importante característica é a glutathiona (GSH), um tripeptídeo intracelular formado por três aminoácidos: glutamato, cisteína e glicina (Figura 8). Sua formação ocorre em duas etapas principais. A primeira sendo a junção do glutamato e da cisteína para formar Y-glutamilcisteína a partir da ação da enzima Y-glutamilcisteína sintetase. Na segunda etapa, a Y-glutamilcisteína reage com a glicina, gerando como produto a glutathiona a partir da enzima glutathiona sintetase (AVERILL-BATES, 2023) (Figura 8).

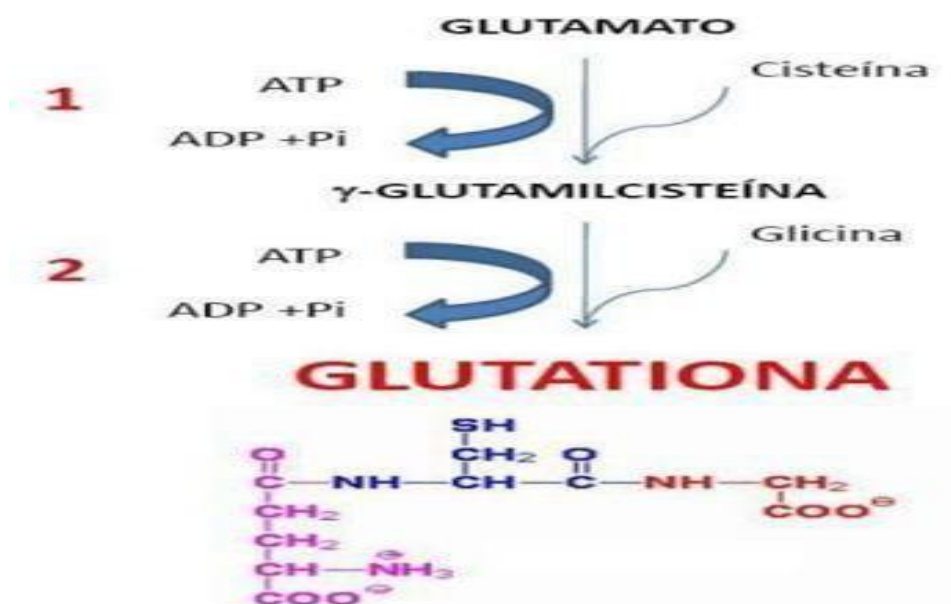


Figura 8: Passo a passo da síntese da glutathiona. A glutathiona é formada pela junção do glutamato e da cisteína para formar Y-glutamilcisteína a partir da ação da enzima Y-glutamilcisteína sintetase. A Y-glutamilcisteína reage com a glicina, gerando como produto a glutathiona a partir da enzima glutathiona sintetase. Figura retirada da Neto, A.S.S.R. (2010). Glutathiona. Envolvimento em defesa antioxidante, regulação de morte celular programada e destoxificação de drogas. (Dissertação de mestrado). Universidade Fernando Pessoa, Porto. Figura 1, p.4.

A GSH é o mercaptano não proteico em maior quantidade no organismo humano, sendo o antioxidante mais importante. Ela é especialmente abundante no fígado e rim, embora esteja presente em níveis mais baixos no cérebro, onde o sistema regulador para a síntese de GSH é independente daquele nos tecidos periféricos (COMMANDEUR; STIJNTJES; VERMEULEN, 1995). A GSH age na

manutenção do sistema antioxidante intracelular, equilíbrio redox, transporte/armazenamento de cisteína, sinalização celular, regulação de algumas atividades enzimáticas, expressões gênicas e diferenciação/proliferação celular. A GSH contém um grupo tiol ativo, presente na cisteína, que é facilmente oxidado e desidrogenado, o que permite que ela atue como um dos principais eliminadores fisiológicos de radicais livres, reduzindo radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radicais hidroxila ($OH^{\cdot}$) e peroxinitritos ($ONOO^-$) (AOYAMA, 2021; LIU et al., 2022). Neste processo, ela atua como um substrato, sendo catalisada pela glutathione peroxidase (GPx) junto com o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), formando água (H_2O) e glutathione oxidada (GSSG). Uma vez consumida, para que possa ser reutilizada é feita uma reciclagem em que a enzima glutathione redutase (GR) com o cofator $NADPH^+$ convertem a GSSG em glutathione reduzida (GSH) (ISKUSNYKH; ZAKHAROVA; PATHAK, 2022; LU, 2001, 2009) (Figura 9).

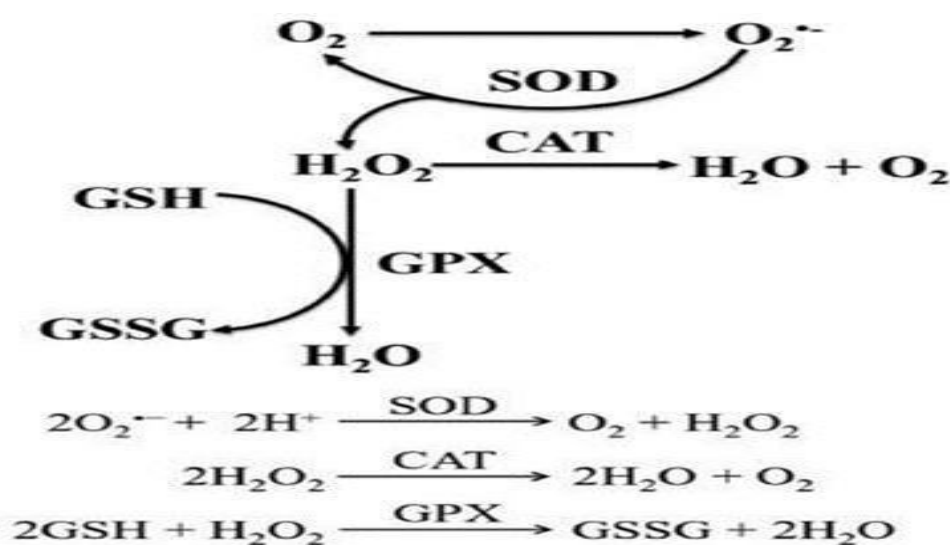


Figura 9: Vias de antioxidação. Eliminação do ânion superóxido e do peróxido de hidrogênio mediado por superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione reduzida (GSH) e glutathione peroxidase (GPX). Adaptada de Liu et al. 2021.

Estudos vem sendo desenvolvidos também para compreender melhor a ação da glutathione como redutora. Como ela possui um grupo sulfidril (-SH) altamente polarizável, isso a torna um bom nucleófilo para reações com compostos eletrofílicos. Esta habilidade de doar elétrons a outros compostos faz da glutathione um excelente agente redutor. A redução de íons de ouro (Au^{3+}) a nanopartículas de ouro (Au^0) pela glutathione envolve a doação de elétrons do grupo tiol (-SH) do resíduo de cisteína na glutathione. Este processo pode ser resumido da seguinte

forma: 1) Oxidação da glutathione, em que o grupo tiol da glutathione é oxidado, levando à formação de uma ligação dissulfeto e, 2) Redução de íons de ouro, em que os elétrons liberados pela oxidação da glutathione reduzem os íons de ouro para formar nanopartículas de ouro (LI et al., 2020a; REQUEJO; LIOPO; ZUBAREV, 2020).

A GSH funciona também como um estabilizante coloidal para as nanopartículas por meio de seus grupos funcionais tiol (-SH) mencionados acima. Esses grupos tiol podem formar fortes ligações covalentes com a superfície do ouro, levando à formação de uma monocamada na superfície da nanopartícula. Esta camada estabiliza eficazmente as nanopartículas, evitando a agregação e mantendo a sua estabilidade coloidal (WU et al., 2014). Ela foi selecionada como agente de proteção neste estudo por fornecer estabilidade e solubilidade em água aos AuNPs por meio dos grupos carboxila presentes em sua estrutura (HARPER et al., 2014).

Além disso, a presença de glutathione na superfície das nanopartículas de ouro contribui para a sua melhor biocompatibilidade. A GSH é encontrada em altas concentrações intracelulares; assim, na superfície das AuNPs, esta sequência peptídica modificada pode servir como um bom biomimetizador, permitindo alta absorção de AuNPs e potencialmente aumentando a biodisponibilidade (HARPER et al., 2014). Isto é particularmente importante para aplicações biomédicas, pois reduz o potencial de citotoxicidade e imunogenicidade, tornando as nanopartículas mais adequadas para utilização em sistemas biológicos. Outra vantagem é a facilitação da síntese de nanopartículas de ouro, agindo como agente redutor e capeador. Sua capacidade de reduzir íons de ouro para formar nanopartículas e cobrir as nanopartículas resultantes contribui para a síntese controlada de nanoestruturas de ouro estáveis com propriedades desejadas (PEM et al., 2019).

Além da estabilização, as propriedades antioxidantes inerentes da glutathione podem aumentar ainda mais a estabilidade das nanopartículas de ouro, mitigando os processos oxidativos que podem levar à degradação ou agregação das nanopartículas. Nanopartículas de ouro estabilizadas com glutathione (GSH-AuNPs) podem ser ainda funcionalizadas com ligantes ou biomoléculas específicas para administração direcionada de medicamentos, imagens e aplicações terapêuticas, aproveitando a natureza biocompatível da glutathione para facilitar as interações com sistemas biológicos (SIMPSON et al., 2013). A GSH possui dois terminais de ácido carboxílico disponíveis que podem ser explorados para acoplar uma ampla gama de

moléculas biologicamente relevantes e úteis em aplicações biomédicas, como as angiotensinas (HARPER et al., 2014).

1.6.3 Propriedades ópticas das AuNPs

Uma outra vantagem da utilização de nanopartículas de ouro é sua propriedade óptica de ressonância plasmônica de superfície (RPS), um fenômeno que vem atraindo atenção significativa em esforços de pesquisa recentes. As propriedades ópticas únicas das nanopartículas de ouro plasmônico levaram à sua ampla implementação em vários campos, particularmente na nanomedicina para diagnóstico de câncer e terapia fototérmica (AKSHAYA et al., 2020; DHEYAB et al., 2023; LUO et al., 2021; SHARIFI et al., 2023; YU et al., 2022). A RPS nas nanopartículas de metais nobres gera fortes campos eletromagnéticos na superfície das partículas, melhorando assim as propriedades radioativas, como absorção e dispersão de luz (HUANG; EL-SAYED, 2010). Os campos elétricos oscilantes da luz interagindo com os elétrons livres nas nanopartículas de ouro causam uma oscilação coletiva da carga do elétron conhecida como plasmons de superfície. Este fenômeno resulta na absorção de luz na porção esverdeada do espectro, enquanto a luz vermelha é refletida, dando origem à característica cor vermelha rica das nanopartículas de ouro. Além disso, à medida que o tamanho das nanopartículas aumenta, o comprimento de onda de absorção muda para comprimentos de onda mais longos e mais vermelhos, levando até à formação de soluções de tons mais arroxeados (KOUSHKI, 2021) (Figura 10).

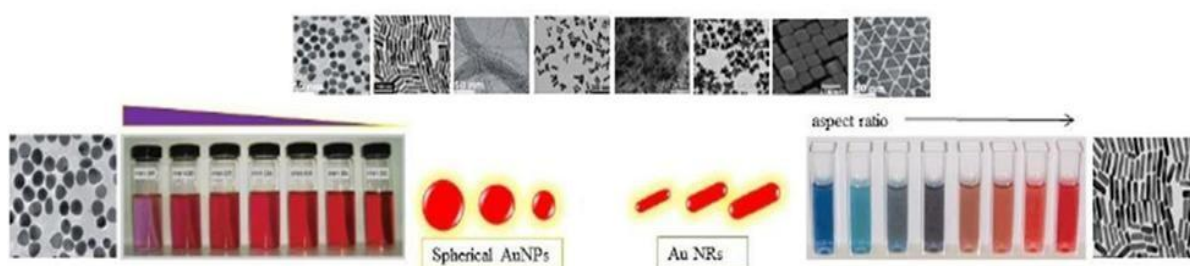


Figura 10: Efeito da ressonância plasmônica de superfície em nanopartículas de ouro. Mudança na cor das soluções de nanopartículas de ouro dependente do formato e tamanho do nanomaterial. Adaptado de Elahi, et al. (2018).

Nanopartículas de ouro, prata e cobre apresentam bandas RPS fortes na região visível, enquanto outros metais apresentam bandas largas e fracas na região UV (CREIGHTON; EADON, 1991). AuNPs mostram a banda SPR em torno de 520

nm na região visível. A banda SPR é afetada pelo tamanho da partícula (LINK; EL-SAYED, 1999) (Figura 10). A banda RPS de AuNPs com tamanho menor que 10 nm é amplamente amortecida devido às mudanças de fase resultantes do aumento da taxa de colisões elétron-superfície em comparação com partículas maiores (KREIBIG; FRAGSTEIN, 1969). Aumentar o tamanho da partícula para o vermelho desloca o comprimento de onda do SPR e, também aumenta a intensidade. Para partículas maiores que 100 nm, o alargamento da banda é óbvio devido às contribuições dominantes das oscilações eletrônicas de ordem superior.

Portanto, a partir desta propriedade e com o uso de um Espectrofotômetro de Absorbância UV-Vis, é possível gerar um gráfico que relaciona a absorbância da matéria com o comprimento de onda da luz, podendo-se inferir uma curva que mostra a presença de nanopartículas, gerada a partir do princípio do espalhamento de luz (ELAHI; KAMALI; BAGHERSAD, 2018). Sendo seu pico máximo a 520 nm, este valor varia de acordo com o objetivo da síntese, com a geração de nanoesferas com tamanhos, cargas e biofuncionalizações diferentes (JABIR et al., 2020; KNITTEL et al., 2020; LIU et al., 2013b; ZHENG et al., 2019a).

Para se observar que a síntese obteve sucesso, um outro indicador é importante de se estudar. É sabido que soluções coloidais de nanopartículas na faixa do pH = 8 são consideradas mais estáveis por criarem um ambiente eletroquímico balanceado sem grandes doações e recebimentos de elétrons, gerando uma solução com menos aglomerados e/ou agregados (ELAHI; KAMALI; BAGHERSAD, 2018).

1.6.4 Superfície da nanopartícula

As propriedades físico-químicas das AuNPs são os aspectos-chave que governam as interações, modulações e respostas celulares dos sistemas imunológicos inato e adaptativo. Cargas nas superfícies são componentes cruciais para estabilizar as AuNPs e suas interação com as células. Portanto, uma maior compreensão das respostas e interações celulares continua a ser um desafio, especialmente quando o inevitável sistema imunológico está envolvido (FAN; CHENG; SUN, 2020).

A carga das nanopartículas desempenha um papel fundamental nas suas interações com sistemas biológicos e é de importância significativa em diversas aplicações biomédicas. As propriedades elétricas das nanopartículas podem

influenciar profundamente seu comportamento, biodistribuição, absorção celular e eficácia geral na administração direcionada de medicamentos, imagens e intervenções terapêuticas (LIU et al., 2021).

Nanopartículas, ao serem expostas a fluidos biológicos, podem adquirir uma camada de proteínas conhecida como corona proteica. A carga das nanopartículas pode influenciar significativamente a composição e conformação da coroa proteica, o que por sua vez afeta o seu destino biológico, incluindo o reconhecimento pelo sistema imunológico, a absorção celular e a eliminação do corpo (MA; HONG; DING, 2020). Ela também influencia sua biodistribuição e acúmulo em tecidos e órgãos específicos. A carga superficial pode ditar a interação das nanopartículas com o endotélio, afetando seu extravasamento e acúmulo nos tecidos alvo. Estudos recentes indicaram que a carga superficial da AuNP é crucial para a solubilidade em água, ligação molecular, hidrofobicidade e interações celulares com células cancerígenas, fibroblastos e células imunológicas (NEJATI et al., 2022). Estudos revelaram que AuNPs carregadas positivamente poderiam induzir respostas inflamatórias mais elevadas, uma vez que AuNPs carregadas e hidrofóbicas são melhores fagocitadas. As cargas superficiais fornecem diferentes capacidades para interagir com as células. Em outras palavras, as catiônicas ligam-se de forma mais eficaz à carga negativa nas membranas celulares, aumentando a fagocitose, em comparação com as aniônicas ou neutras (WANG et al., 2015). Por outro lado, um estudo que relatou a citotoxicidade das AuNP afirmou que a carga negativa exibiu maior citotoxicidade do que a AuNP carregada positivamente, o que pode ser devido ao aumento da extensão de absorção da AuNP (LIU et al., 2013a).

Além disso, nanopartículas carregadas podem ser funcionalizadas com ligantes direcionados para facilitar interações específicas com células ou tecidos, permitindo a entrega direcionada de medicamentos e aplicações de imagem. Apesar de uma melhor eficácia na entrega de aplicações, descobriu-se que as cargas catiônicas nas nanopartículas apresentam maior citotoxicidade. Assim, as cargas aniônicas tendem a ter menor citotoxicidade; consequentemente, a captação celular de AuNPs aniônicas pode causar efeitos biológicos menores (JIA et al., 2017). As forças repulsivas ou atrativas entre nanopartículas são influenciadas pela sua carga superficial. Isto pode afetar a sua estabilidade em ambientes biológicos e a sua propensão para agregação, o que por sua vez afeta o seu tempo de circulação, biodisponibilidade e potenciais interações com células e tecidos.

Até o momento, a maioria das aplicações *in vivo* de nanomateriais envolveram funcionalizações com PEG para minimizar a formação de coroa proteica e concomitante remoção rápida das AuNPs da circulação via opsonização (MA; HONG; DING, 2020; PELAZ et al., 2015) embora a ligação às proteínas plasmáticas ainda seja possível, incluindo interações com IgG e fibrinogênio (AGGARWAL et al., 2009). Alguns estudos exploraram como a modificação dos revestimentos superficiais do PEG, como a introdução de porções carregadas, influencia a formação da coroa proteica e as subsequentes interações com componentes no sangue e a absorção pelos macrófagos (ALBANESE; TANG; CHAN, 2012; DRIDI et al., 2024; JANG et al., 2021).

No caso das GSH-AuNPs, é hipotetizado na literatura que os grupos amina e as porções carboxilato da glutathiona ajudam a minimizar a adsorção de proteínas que pode levar à redução da opsonização, possibilitando maior tempo de circulação, menor degradação e facilitação de chegada à BHE (SIMPSON et al., 2013). Compreender o impacto da carga das nanopartículas sobre estes fatores é crucial para avaliar a sua segurança e biocompatibilidade. Compreender esta dinâmica é crucial para otimizar o design de nanopartículas para aplicações biomédicas específicas.

1.6.5 Tamanho das nanoesferas de ouro

O tamanho das nanopartículas é um parâmetro crítico que influencia significativamente seu comportamento, interações com sistemas biológicos e adequação para diversas aplicações biomédicas. Compreender a importância do tamanho é essencial para otimizar sua eficácia na administração direcionada de medicamentos, imagens e intervenções terapêuticas.

Seu tamanho impacta profundamente sua absorção e penetração celular. Nanopartículas ultrapequenas ($< 2\text{nm}$) podem apresentar maior internalização celular e penetração nos tecidos devido à sua capacidade de atravessar barreiras biológicas e interagir com componentes celulares com maior facilidade. Porém, ao mesmo tempo, são capazes de adentrar o núcleo celular e destruir o DNA. Nanopartículas grandes ($\geq 50\text{nm}$) podem ter interações dificultadas com células e tecidos, influenciando sua eficiência de absorção e distribuição nos tecidos. Elas podem causar danos a células do organismo pelo seu grande tamanho, aumentando a probabilidade de aglomeração ou agregação (ALKILANY; MURPHY, 2010).

Seu tamanho também desempenha um papel crucial na sua biodistribuição e eliminação do corpo. Nanopartículas menores podem potencialmente extravasar dos vasos sanguíneos de forma mais eficiente e acumular-se nos tecidos alvo. Em contraste, nanopartículas maiores podem ter tempos de circulação prolongados ou acumulação preferencial em órgãos específicos, influenciando suas potenciais aplicações na administração direcionada de medicamentos e na imagiologia (SODIPO; MOHAMMED, 2024). Hirn e colaboradores (2011) observaram que nanopartículas ultrapequenas (1.4 nm e 2.8 nm) se distribuem mais pelos órgãos, como o fígado e rim, quando comparados com as maiores (80 nm) quando injetadas intravenosamente em ratas fêmeas Wistar-Kyoto (HIRN et al., 2011). Dados parecidos também foram encontrados por Simpson e colaboradores (2013) em que nanopartículas de 1.2 nm foram injetadas de modo subcutâneo em camundongos machos Balb/c. Além do fígado e rim, também foram encontradas no baço, coração e pulmão (SIMPSON et al., 2013).

A relação área de superfície/volume das nanopartículas, que é inerentemente influenciada pelo seu tamanho, impacta sua capacidade de funcionalização e carregamento de medicamentos. Nanopartículas pequenas fornecem uma área de superfície maior para funcionalização com ligantes direcionados, agentes terapêuticos ou sondas de imagem, permitindo personalização precisa para aplicações biomédicas direcionadas (SODIPO; MOHAMMED, 2024).

O tamanho das nanopartículas afeta sua capacidade de navegar por barreiras biológicas, como a barreira hematoencefálica ou o endotélio. A permeabilidade dependente do tamanho pode influenciar o potencial das nanopartículas para atravessar barreiras fisiológicas e acessar locais anatômicos específicos para fins diagnósticos e terapêuticos. É de extrema importância que as nanopartículas sejam capazes de atravessar a BHE, uma vez que têm ações terapêuticas e de entrega de drogas e fármacos, como discutido anteriormente. Aljohani e colaboradores (2022) encontraram AuNPs de 7.8 nm no fígado e no rim, sendo que a quantidade encontrada nos órgãos foi diretamente proporcional à dose injetada no peritônio. Estas AuNPs tiveram a capacidade de passar pela BHE e se instalar no cérebro, porém de modo não proporcional à dose injetada (ALJOHANI et al., 2022). Jong e colaboradores (2008) também encontraram AuNPs no cérebro injetadas de modo intravenoso e observaram que as de 10 nm estavam presentes em diversos órgãos como sangue, fígado, rim, baço, testículos, coração, pulmão e cérebro, enquanto as

maiores (50 nm, 100 nm e 150 nm) foram somente encontradas no sangue, fígado e rim. Eles demonstraram que a distribuição pelos tecidos é tamanho-dependente sendo as menores com maior capacidade de dispersão no organismo (DE JONG et al., 2008).

Além destas interações, o tamanho das nanopartículas pode influenciar uma potencial toxicidade e respostas biológicas. As interações dependentes do tamanho das nanopartículas com células, organelas e biomoléculas podem impactar sua biocompatibilidade, imunogenicidade e potenciais efeitos adversos, necessitando de avaliações abrangentes para uso biomédico seguro. De acordo com a literatura, a maioria dos estudos de toxicidade foi realizado em modelos *in vitro*, existindo poucos relatos toxicológicos em animais. Li e colaboradores (2018) observaram que AuNPs biofuncionalizadas com PEG aumentavam a toxicidade proporcionalmente à diminuição de seu tamanho (6,2 – 61,2 nm) em uma cultura de células Hela, a partir do aumento do estresse oxidativo (LI et al., 2018). Chaves e colaboradores (2018) também observaram toxicidade em nanopartículas menores (10 nm) sintetizadas com citrato, principalmente em relação a danos ao DNA (LOPEZ-CHAVES et al., 2018). Ao mesmo tempo, alguns trabalhos observaram efeitos opostos, em que as AuNPs agiam diminuindo proliferação celular e balanceando os efeitos deletérios da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (LI et al., 2018; LOPEZ-CHAVES et al., 2018).

Os estudos que avaliaram a toxicidade das AuNPs biofuncionalizadas com GSH apontam dados positivos da relação tamanho/segurança. Simpson e colaboradores (2013) compararam GSH-AuNPs ultrapequenas (1.2 nm) com PEG-AuNPs de mesmo tamanho em camundongas fêmeas Balb/c e observaram que a primeira não causou morbidades até altas concentrações e se distribuiu mais pelos órgãos primários demonstrando maior dissipação e clearance ao longo do tempo. O estudo aponta também que a utilização da glutathione no lugar do PEG é benéfica por menor toxicidade, maior eficiência de internalização e interações de ligação mais eficientes com alvos de doenças proteicas (SIMPSON et al., 2013). Corroborando com estes dados, GSH- AuNPs de 6 nm, em média, demonstraram menor morbidade e mortalidade, com consequente maior biocompatibilidade em sistemas biológicos em um estudo com embriões de Zebrafish (*Danio rerio*). Neste caso, a glutathione foi usada principalmente por sua ação estabilizadora (HARPER et al., 2014). Pem e colaboradores compararam nanopartículas de ouro e prata

biofuncionalizadas com glutatona e cisteína e observaram que o uso de biotióis geram nanomateriais mais estáveis. O estudo demonstrou que especificamente com a adição de glutatona, foram geradas partículas de 7 nm e 65 nm, que foram capazes de gerar menos efeitos tóxicos em um modelo murino de fibroblastos L929 (PEM et al., 2019).

Estes estudos demonstraram que a mudança dos efeitos e interações das nanopartículas em sistemas biológicos está diretamente ligado também ao tamanho delas e a escolha do melhor tamanho está diretamente ligado ao objetivo e pergunta de cada estudo e como se pretende utilizar as nanopartículas.

Algumas características tornam as AuNPs uma plataforma extremamente versátil e promissora no campo da nanomedicina. Elas apresentam grande relação superfície-volume, que por apresentar uma grande superfície de contato proporciona a possibilidade do carregamento de uma grande quantidade de moléculas em um grande volume; excelente biocompatibilidade, baixa toxicidade e facilidade de passagem pela barreira hematoencefálica (BHE) (NEJATI et al., 2022; SIMPSON et al., 2013; SOUSA et al., 2016a).

1.6.6 Biodistribuição

A biodistribuição é um dos parâmetros importantes considerados no design de nanopartículas para a entrega direcionada de medicamentos e aplicações de teranóstica (tratamento + diagnóstico). Este parâmetro determina a biocompatibilidade e a toxicidade das nanopartículas por meio da circulação sanguínea (ZHAO; SULTAN; LIU, 2019). A biodistribuição das nanopartículas de ouro ocorre por meio de uma interação complexa com proteínas no sangue. Fatores físicos, como formas, tamanhos, dosagem e via de administração das nanopartículas, determinam a biodistribuição ideal das AuNPs (KUMAR et al., 2023a). Barreiras biológicas e físicas, como o tráfego intracelular, forças de cisalhamento, adsorção de proteínas e depuração rápida, limitam a porcentagem da dose administrada de nanopartículas que alcança os locais terapêuticos alvo (LI et al., 2018).

As AuNPs são identificadas pelo sistema fagocítico mononuclear (MPS) ou sistema reticuloendotelial (RES) como substâncias estranhas que precisam ser sequestradas, degradadas ou eliminadas. Para melhorar a biodistribuição e a eficiência de entrega aos locais alvo, é necessário desenvolver as nanopartículas

para <escondê-las= da depuração pelos sistemas biológicos e aumentar a acúmulo de nanopartículas nos locais alvo (SODIPO; MOHAMMED, 2024). Fatores como o tamanho, a funcionalização, a dose e a via de administração são importantes de se estudar porque podem afetar o tempo de circulação, penetração nos tecidos e acumulação em órgãos e tecidos específicos, afetando assim as suas aplicações terapêuticas e diagnósticas.

Durante a circulação das AuNPs, elas encontram e interagem com diversas proteínas do sangue. As proteínas podem ser adsorvidas nas nanopartículas por meio de forças eletrostáticas, hidrofóbicas e de van der Waals (CEDERVALL et al., 2007; SOTNIKOV et al., 2019; VAISHANAV et al., 2016) para formar uma corona, que determina a biodistribuição para vários tecidos e órgãos. A corona desempenha um papel crucial no reconhecimento da imunidade inata e causa rápida eliminação pelas células fagocíticas (RAMPADO et al., 2020). Além disso, a ligação de opsoninas a AuNPs pode levar ao rápido reconhecimento imunológico que inicia o sistema fagocítico e consequente eliminação (LI; HUANG, 2010). A corona pode aumentar o tamanho das partículas, levando a uma maior depuração pelo RES e causando menos captação pelas células-alvo (MA; HONG; DING, 2020). A modificação da superfície das nanopartículas com ligantes que diminuam a adsorção de proteínas, opsonização e subsequente fagocitose das nanopartículas pelas células não parenquimatosas do fígado é desejável para evitar a captação de RES e prolongar o tempo de circulação dessas partículas no sangue (DRIDI et al., 2024; SONAVANE; TOMODA; MAKINO, 2008a). Simpson e colaboradores (2013) observaram que GSH-AuNPs de 1.2 nm apresentavam maior biodistribuição nos órgãos como pulmão, fígado e rim do que PEG-AuNPs, e discutiram como a GSH pode atuar como um estabilizante e um ligante mais biocompatível, ajudando no desenvolvimento de um nanocomplexo bastante promissor para estudos *in vivo*, gerando um nanomaterial de baixa imunogenicidade, tempo de clearance e maior biocompatibilidade (SIMPSON et al., 2013). A GSH é encontrada em altas concentrações intracelulares; assim, na superfície da AuNP, esta sequência peptídica modificada pode servir como um bom biomimizador, permitindo alta absorção de AuNP e potencialmente aumentando a biodisponibilidade e biodistribuição (ZHOU et al., 2014).

Como citado acima, outros fatores também influenciam a biodistribuição como o tamanho, a dose e a via de administração. Por meio de análises por

Espectrometria de massa acoplada a plasma (ICP-MS), Simpson e colaboradores (2013) observaram que GSH-AuNPs de 1.2 nm injetadas subcutaneamente em camundongas fêmeas Balb/c se distribuíram pelo rim, fígado, baço, pulmão, sangue e urina. Eles injetaram doses de 10 μ M a 60 μ M em três tempos diferentes, 24h, 2 e 4 semanas e perceberam que usando análise que nanopartículas de ouro revestidas com glutathione não causam morbidade em qualquer concentração até 60 μ M inclusive e atingem órgãos primários, embora forneçam dissipação gradual e liberação ao longo do tempo (SIMPSON et al., 2013). Corroborando com estes dados, Hirn e colaboradores (2011) administraram, em ratas Wistar-Kyoto, AuNPs marcadas com rádio carregadas negativamente de cinco diferentes tamanhos (1.4, 5, 18, 80, 200 nm) e AuNPs de 2.8 nm com cargas superficiais opostas por injeção intravenosa em ratos. Após 24 h, a biodistribuição foi medida quantitativamente por espectrometria gama e a partir dos dados coletados, eles discutiram que o tamanho e a carga superficial das nanopartículas de ouro determinam fortemente a biodistribuição. A maioria se acumulou no fígado com aumento de 50% para AuNPs de 1.4 nm. Entre as 1.4 nm e 5 nm, o acúmulo aumentou acentuadamente com a diminuição do tamanho; ou seja, um aumento linear com a área de superfície específica volumétrica. As AuNPs de 2,8 nm carregadas positivamente levaram a acúmulos significativamente diferentes em vários órgãos. Estas nanopartículas foram capazes de atravessar a BHE e se instalar no cérebro, sendo encontradas doses bem menores do que aquelas encontradas em outros órgãos (HIRN et al., 2011).

Outro estudo que conseguiu sintetizar nanopartículas capazes de adentrar o cérebro foi o de Sonavane e colaboradores (2008). As AuNPs foram injetadas na veia da cauda de camundongos machos ddY na dose de 1g/kg e 24h após a injeção foram realizadas as análises por ICP-MS. O grupo sintetizou nanopartículas de 15 nm a 200 nm e observaram que as AuNPs de todos os tamanhos foram principalmente acumuladas em órgãos como fígado, pulmão e baço. Eles também observaram acúmulo dependente de tamanho sendo as menores de 15 nm as que mais se distribuíram, sendo encontradas maiores quantidades de ouro em todos os tecidos estudados, em todos os tecidos, incluindo sangue, fígado, pulmão, baço, rim, cérebro, coração e estômago. Eles apontaram que interessante, as de 15 e 50 nm foram capazes de passar pela barreira hematoencefálica, enquanto as de 200 nanômetros mostraram uma presença muito pequena em órgãos, incluindo sangue,

cérebro, estômago e pâncreas (SONAVANE; TOMODA; MAKINO, 2008b). Outros estudos utilizando nanopartículas de tamanhos parecidos e diferentes tempos de análise também demonstram que AuNPs menores e carregadas negativamente têm melhor biodistribuição pela sua facilitação de atravessar membranas e barreiras e absorção, sendo o fígado e o rim os órgãos onde são encontradas a maior quantidade de nanopartículas (IRVIN-CHOY et al., 2021). Mesmo sendo analisados em diferentes tempos, desde 24h até 28 dias, o maior acúmulo foi observado nas primeiras horas, havendo grande depuração e clearance renal ao longo do tempo (KOZICS et al., 2021). Em relação às vias de administração, é sabido pela literatura que a via intravenosa apresenta uma maior biodisponibilidade uma vez que não é necessário passar pelo metabolismo de primeira passagem, assim como a intramuscular, sublingual e transdérmica. Mesmo assim, de acordo com estudos, as AuNPs conseguem atravessar a BHE sendo injetadas por meio de outras vias como a intraperitoneal. A vantagem da via intravenosa seria a maior disponibilidade de droga na corrente sanguínea e capacidade de uma maior quantidade de nanopartículas atravessar a BHE (ALJOHANI et al., 2022; KIM et al., 2020; ZHAO; SULTAN; LIU, 2019).

Como as nanopartículas apresentam todas essas propriedades versáteis e benéficas, elas vêm sendo estudadas para tratamentos e diagnósticos de diversas doenças, como o câncer de mama, o câncer de pele, diabetes e sepse (FERREIRA et al., 2023; SELIM; ABD-ELHAKIM; AL-AYADHI, 2015; SELIM; HENDI, 2012; ZHENG; CHOW, 2017), assim como doenças neurológicas, como o Alzheimer, o Parkinson e depressão (LI et al., 2024; MULLER et al., 2017; UPADHYAY et al., 2023). Dentre estas diversas doenças destaca-se o Acidente Vascular Encefálico (AVE) isquêmico, foco de inúmeros trabalhos ao longo dos anos.

1.7 Nanoesferas de ouro e o AVE isquêmico

As nanoesferas de ouro vêm sendo utilizadas em diversos modelos de isquemia, tanto como tratamentos como carreadores de drogas. Entre pesquisas *in vitro* e *in vivo*, pesquisadores do mundo todo tentam entender quais são seus mecanismos de proteção e entrega, e como mudanças no seu tamanho e rota de síntese modificam suas ações biológicas. Na área da aplicação terapêutica, já foi observada redução no volume de infarto, escore neurológico, estresse oxidativo, assim como ativação de micróglia e regulação de moléculas pró-apoptóticas (EL-

SAYED; YOUSSEF; SHALABY, 2017; LIU et al., 2013a; NAZARIAN et al., 2020). Ao mesmo tempo que aumentam a viabilidade celular, citocinas anti-inflamatórias e a respiração mitocondrial. Zheng e colaboradores (2019) observaram que nanopartículas de 20 nm sintetizadas com citrato de sódio foram capazes de aumentar a viabilidade celular, ao mesmo tempo que diminuem o estresse oxidativo e apoptose, por meio da ativação da via de sinalização Akt e mitocondrial em cultura cortical primária de ratos. Ações contrárias foram observadas quando tratadas com nanopartículas de 5 nm (ZHENG et al., 2019a). Corroborando com estes dados, Liu e colaboradores (2013) também observaram ações protetoras de nanopartículas de 20 nm, com aumento de citocinas anti-inflamatórias e redução da ativação de astrócitos e micróglia e de moléculas pró-apoptóticas em um modelo de oclusão da artéria cerebral média (MCAo) em ratos. Também foram observados efeitos opostos em nanopartículas de 5 nm (LIU et al., 2013b).

Estudos também demonstram suas ações como carreadores com o objetivo de aumentar a biodisponibilidade de drogas e substâncias, redução das doses necessárias para alcançar a resposta ideal e transporte do composto terapêutico para a célula de um tecido alvo, principalmente pela facilidade de sua degradação ao longo do organismo (SHENDE; SARDESAI; GAUD, 2018). Nazarian e colaboradores (2020) biofuncionalizaram nanopartículas de ouro, sintetizadas com citrato de sódio, com modafinil, um fármaco antioxidante e anti-inflamatório aprovado pela US Food and Drug Administration (FDA) considerado um estimulante para o sistema nervoso central. Neste trabalho, ratos Wistar foram submetidos à cirurgia de MCAo e foi observado que o tratamento do conjugado e de células-tronco diminuiu apoptose, volume de infarto, apresentando melhores resultados que o modafinil isolado (NAZARIAN et al., 2020). A importância da bioconjugação também já foi estudada em culturas celulares. Jabir e colaboradores (2020) avaliaram os efeitos do linalol, um óleo essencial que apresenta atividade anticancerígena, em células SKOV-3 de câncer de ovário. Como seu uso é restrito devido à sua alta toxicidade, ele foi biofuncionalizado com nanopartículas de ouro com o objetivo de reduzir sua dose terapêutica. Eles puderam observar que o bioconjugado apresentou um alto potencial terapêutico e deve ser dada especial atenção como sistema de administração de medicamentos anticancerígenos, uma vez que apresentou mais toxicidade contra a linha celular cancerígena quando comparado com o linalol e as nanopartículas isoladas (JABIR et al., 2020).

Na literatura também há estudos com nanopartículas ultrapequenas (< 2 nm) e grandes (> 30 nm) sendo observadas ações opostas às de 20 nm. Ratos Wistar foram submetidos ao MCAo e tratados com nanopartículas de 20 nm e 50 nm e foram observadas ações protetoras geradas pelas primeiras e efeitos contrários pelas últimas (EL-SAYED; YOUSSEF; SHALABY, 2017). O trabalho discute que nanopartículas maiores são mais prejudiciais por serem mais propensas à agregação. Em relação às nanopartículas ultrapequenas, os estudos focaram mais na sua biodistribuição e toxicidade, uma vez que há uma grande discussão na literatura que por causa de seu pequeno tamanho, elas têm maior probabilidade de adentrar o núcleo celular e gerar apoptose (ALKILANY; MURPHY, 2010). Simpson e colaboradores (2013) não observaram morbidade em camundongos Balb/c que receberam dosagens até 60 μM de nanopartículas de 1.2 nm por até 4 semanas. Observou-se uma dissipação gradual dos órgãos e clearance ao longo do tempo analisando-se sangue e urina (SIMPSON et al., 2013). Por outro lado, Souza e colaboradores (2012), por meio de imageamento por microscopia eletrônica de transmissão de varredura quantitativa (STEM), quantificaram as nanopartículas intracelulares de 2 nm e encontraram agregados no citoplasma e núcleo (SOUSA et al., 2012).

Nestes últimos casos citados, as nanopartículas foram biofuncionalizadas com GSH, que desde meados de 2020, vem emergindo como um popular polímero biodegradável utilizado na preparação de AuNPs (Figura 11). GSH-AuNPs mostraram enorme potencial como veículo de distribuição de medicamentos. O GSH é um dos mais aceitos entre os diferentes polímeros biodegradáveis devido ao seu longo tempo de vida, aplicação clínica permanente, suas características de degradação favoráveis e seu potencial para administração sustentada de medicamentos (WANG et al., 2016) e um alvo terapêutico promissor para o tratamento de doenças neurodegenerativas.

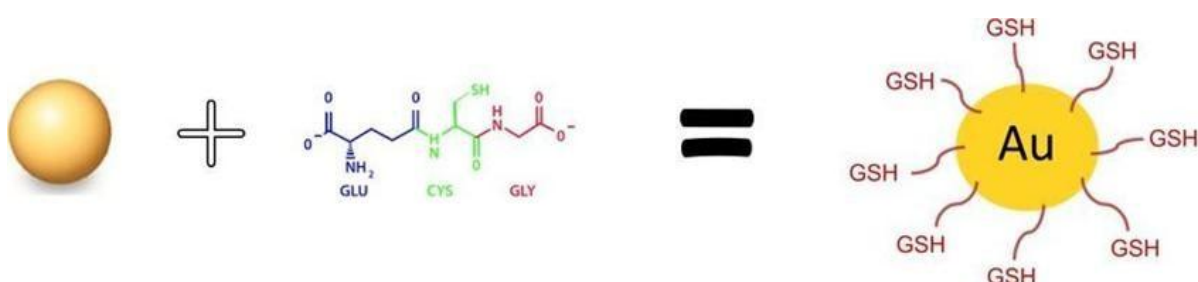


Figura 11: Esquema da funcionalização das AuNPs com GSH. As GSH-AuNPs são sintetizadas a partir da adição de HAuCl_4 , do redutor NaBH_4 e da glutathione em água miliQ. A solução é homogeneizada em agitador por 15 minutos e logo depois centrifugada para retirada da glutathione livre.

A GSH já vem sendo estudada em modelos de isquemia e as perspectivas são positivas. Fukunaga e colaboradores (2013) submeteram camundongos C57BL/6 à cirurgia de oclusão transitória bilateral da artéria carótida comum (BCAAo) e administraram GSH via oral por 10 dias consecutivos e observaram restauração dos níveis de GSH, diminuindo marcadores oxidativos e nitrotirosinas, prevenindo a morte celular na região CA1 do hipocampo (YABUKI; FUKUNAGA, 2013). Também foram observados efeitos neuroprotetores em ratos submetidos à MCAo. Wang e colaboradores (2022) observaram que uma administração conjunta com dopamina melhora déficits neurológicos, diminui volume de infarto, estresse oxidativo e citocinas pró-inflamatórias na região do estriado (WANG et al., 2022). Ratos Sprague-Dawley foram submetidos à MCAo e foi observado que a GSH oral não apenas aumenta os níveis de GSH intracelular e cisteína no estriado e córtex, mas também pode diminuir o aumento de concentração intracerebral de glutamato causada pela isquemia, além de ser capaz de reparar a barreira hematoencefálica destruída (CHEN et al., 2020).

Além disso, estudos também vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de ligar drogas e substâncias à GSH bioconjugada às nanopartículas. As interações metal-ligante mais extensivamente estudadas são entre tióis e AuNPs, concentrando-se em alcanotióis não polares que são insolúveis na água. Para melhorar a sua versatilidade química em ambientes aquosos, os tióis naturais, como cisteína (Cys) (CHAI et al., 2010a) e a glutathione reduzida (GSH) (MAO; LI; TANG, 2011) têm sido usados para estabilizar nanopartículas. Wo Hu e colaboradores (2014) estudaram a ligação GSH/AuNP e desenvolveram estratégias sintéticas e de purificação para fornecerem uma rota fácil para o desenvolvimento de uma biblioteca de AuNPs estabilizadas com peptídeos biocompatíveis sob medida para aplicações biomédicas (WU et al., 2014). Estudos como este são de extrema importância para facilitação do desenvolvimento de fármacos e consequente tratamento de doenças.

Mesmo já havendo diversos estudos de AuNPs e GSH para o tratamento da isquemia cerebral, ainda não foram realizadas pesquisas que utilizam os dois associados. Como pode ser observado, há um grande potencial para seu uso e por

isso decidimos avaliar seus efeitos nas vias deletérias do AVE isquêmico e analisar seu possível potencial no tratamento.

<Pesquisa é ver o que todos viram, e pensar o que ninguém mais pensou.=

Albert Szent-Györgyi

Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina, 1937

2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

2.1 Justificativa

O acidente vascular encefálico isquêmico (AVEi) é uma das principais causas de incapacidade e morte no mundo todo. Ele ocorre quando há cessação ou redução do fluxo sanguíneo para o tecido cerebral, causando morte neuronal. Atualmente, as opções de tratamento são limitadas e muitas vezes ineficazes, especialmente devido à curta janela terapêutica e aos efeitos colaterais significativos dos tratamentos disponíveis, como a trombólise e a trombectomia. Por esta razão, há uma necessidade urgente de desenvolver novas abordagens terapêuticas que possam oferecer proteção e melhorar a recuperação funcional de pacientes após um AVEi. As AuNPs têm mostrado características promissoras em estudos pré-clínicos, incluindo a redução do volume do infarto e a atenuação do estresse oxidativo e da inflamação, gerando neuroproteção em diversos modelos de isquemia. Essas propriedades, aliadas à capacidade das AuNPs de atuar como nanocarreadores, aumentando a biodistribuição e a eficácia de agentes terapêuticos rapidamente degradados pelo organismo destacam a relevância de investigar mais profundamente essa abordagem.

A biofuncionalização das AuNPs com a glutathione como estabilizante e possível agente terapêutico, por suas ações antioxidantes, gerou grande interesse para terapias contra o estresse oxidativo e os danos celulares associados à isquemia cerebral. Esta ligação também pode melhorar sua biocompatibilidade e reduzir potenciais efeitos tóxicos, aumentando a eficiência do tratamento. Este estudo visa, portanto, avaliar a eficácia dessas nanopartículas biofuncionalizadas em modelos de isquemia cerebral, oferecendo uma abordagem inovadora e potencialmente mais eficaz para o tratamento de uma condição que afeta milhões de pessoas globalmente. Os resultados obtidos poderiam abrir caminho para novas terapias e melhorar significativamente a qualidade de vida dos pacientes acometidos por esta doença.

2.2 Objetivo geral

Avaliar a eficácia de nanopartículas de ouro biofuncionalizadas com glutathione no tratamento de fatias hipocâmpais submetidas à privação de oxigênio e glicose

2.2.1 Objetivos específicos

- Sintetizar e caracterizar as nanopartículas de ouro controle (AuNPs) e biofuncionalizadas com glutathione (GSH-AuNPs);
- Analisar o dano celular gerado nos grupos controle e tratados com AuNPs e GSH-AuNPs submetidos ou não à privação de oxigênio e glicose;
- Quantificar a liberação de glutamato das fatias hipocâmpais dos grupos controle e tratados com AuNPs e GSH-AuNPs submetidas ou não à privação de oxigênio e glicose;
- Quantificar a atividade de caspases-3 e -9 nas fatias hipocâmpais dos grupos controle e tratados AuNPs e GSH-AuNPs submetidas ou não à privação de oxigênio e glicose;
- Avaliar a biodistribuição das AuNPs e GSH-AuNPs no cérebro, fígado e rim.

<O que observamos não é a natureza em si, mas a natureza exposta ao nosso método de questionamento.=

Werner Heisenberg

Prêmio Nobel de Física, 1932

3 MÉTODOS

3.1 Síntese de nanopartículas de ouro

Foram diluídos 250uL de HAuCl_4 a 0,1M em 750uL de água para injeção em um tubo do tipo eppendorf. Em um béquer de vidro, 7,8mL de água para injeção foram adicionados e misturados à diluição de ouro descrita anteriormente. O pH foi ajustado com fita de pH para 8 com NaOH 1M. Depois, foram adicionados 546uL de NaBH_4 (solução estoque de 2mg/mL) na solução final, momento em que a solução muda de cor de amarelo claro para vermelho escuro. Esta solução foi mantida sob agitação por 15 minutos para redução do HAuCl_4 . Após a agitação, o volume foi completado para 30mL, a solução foi colocada em um tubo tipo falcon de 50mL, devidamente identificada e armazenada à temperatura ambiente. A solução foi utilizada em seguida para a caracterização e estudos no modelo isquêmico (Figura 12).

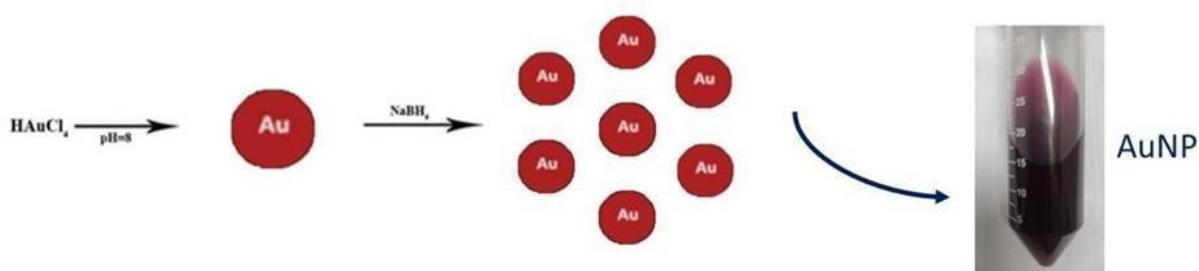


Figura 12: Esquema da síntese das nanopartículas de ouro. As nanopartículas foram sintetizadas a partir da mistura de HAuCl_4 , o pH foi ajustado para 8 e em seguida foi acrescentado o NaBH_4 . O NaBH_4 foi usado como redutor para a nucleação, crescimento e multiplicação das esferas. Modificado de Pongsuchart et al. 2012.

3.2 Síntese de nanopartículas de ouro com GSH (GSH-AuNP)

Foram pesados 0,0454g de GSH e adicionados a 7.8mL de água para injeção em um béquer de vidro até total diluição. Em um tubo tipo eppendorf, foram diluídos 250uL de HAuCl_4 a 0,1M em 750uL de água para injeção e misturados à diluição descrita anteriormente. O pH foi ajustado com fita de pH para 8 com NaOH 1M. Depois, foram adicionados 546uL de NaBH_4 (solução estoque de 2mg/mL) na solução final, momento em que a solução muda de cor de amarelo claro para vermelho escuro. Esta solução foi mantida sob agitação por 15 minutos para redução do HAuCl_4 . Após a agitação, o volume foi completado para 30mL, a solução foi colocada em um tubo tipo falcon de 50mL, devidamente identificada e armazenada à temperatura ambiente (Figura 12).

Após a síntese, a solução de nanopartículas de ouro com GSH foi centrifugada em uma ultracentrífuga (Sorvall® Ultra PRO 80 – DU PONT) a 151.741G (46.000 rpm) por 2 horas a 20°C para retirada do excesso de GSH não ligada às nanopartículas. O sobrenadante foi guardado em um tubo tipo falcon de 50mL e o pellet foi ressuspensionado com água para injeção, para um volume final de 30mL, sendo utilizado em seguida para a caracterização e estudos no modelo isquêmico (Figura 13).

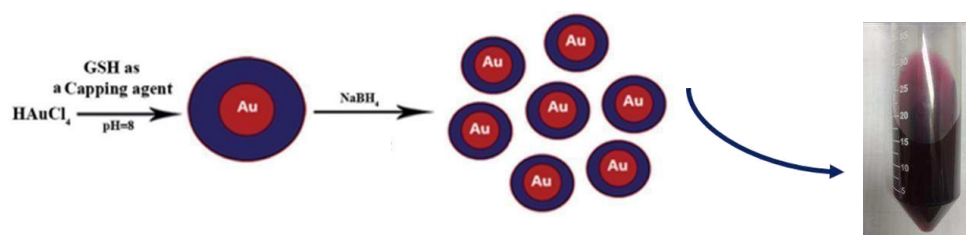


Figura 13: Esquema da síntese das nanopartículas de ouro funcionalizadas com glutatona. As nanopartículas foram sintetizadas a partir do HAuCl_4 , o pH foi ajustado para 8 e em seguida foi acrescentado o NaBH_4 . O NaBH_4 foi usado como redutor para a nucleação, crescimento e multiplicação das esferas e a glutatona como estabilizador. Modificado de Pongsuchart et al. 2012.

3.3 Caracterização das nanopartículas de ouro

A forma das nanopartículas foi inferida usando um espectrofotômetro de UV-VIS (Varioskan LUX – Thermo Scientific). Para realização destas medidas, 350uL das soluções foram colocadas em um poço de uma placa de 96 poços, sendo diluídos quando necessário. Foi realizado um espectro de absorvância no intervalo de 400nm a 800nm. O pico gerado pelo espectro identifica a forma da nanopartícula. Para definir a concentração de ouro, o valor de absorvância gerado a 400nm foi adicionado na parte da densidade óptica (OD) da Tabela 1, que foi desenvolvida no Centro de Nanotecnologias em Nanomateriais e Grafeno (CTNANO).

Tabela 1: Modelo de Tabela para quantificação de ouro em soluções coloidais formadas por nanoesferas de ouro. A partir da OD, retirada da leitura da absorvância da amostra, do raio da nanoesfera e do fator de diluição (F.C) é possível obter diversas informações a respeito da solução, como a massa de cada esfera, a $[\text{Au}]$, a massa total, o número de nanopartículas e a $[\text{NP}]$. Com estes dados pode-se gerar diluições e utilizar a soluções em modelos biológicos.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1	Formulas								
2	Observações:			OD400 corrigido					
3	OD (400 nm)			0,000					
4	Raio (nm)								
5	F.C		0,57						
6	Diluição		1,0						
7									
8	D (nm)		0,0						
9	V (nm ³)		0						
10	A (nm ²)		0						
11									
12	Massa esfera		0,00E+00 g						
13	[Au] na solução		0,00E+00 mol/L						
14	Massa Total		0,000 g em 1000 mL						
15	Número NP	#DIV/0!	partículas em 1000 mL						
16	Concentração NP	#DIV/0!	mol/L						
17									
18									
19									

Tabela de caracterização		
Vol uma NP		0 nm ³
Massa uma NP		0,00E+00 g
[Au]		0,00E+00 mol/L
Conc m/L		0,00E+00 g em 1000 mL
n° de NP/L	#DIV/0!	partículas em 1000 mL
[NP]	#DIV/0!	mol/L

O potencial Zeta (carga) foi determinado usando o Zetasizer (Nano – ZS90, Malvern), um equipamento que utiliza de técnicas de espalhamento de luz e análise de mobilidade de partículas em um campo elétrico. Para realização destas medidas, em uma cubeta apropriada, 100uL da amostra foram diluídos em 900uL de água tipo miliQ. O índice de refração utilizado foi 9,9 e o índice de absorção foi 100. Para análise do potencial Zeta foram realizadas 3 leituras em cada uma das 70 corridas.

A concentração de ouro nas soluções foi analisada por espectrofotômetro de UV-VIS (Varioskan LUX – Thermo Scientific) a 400nm. Para realização destas medidas, 350uL das soluções foram colocados em poços de uma placa de 96 poços. Para sua determinação foram fornecidos a OD, obtida da análise de espectrometria, o raio da nanoesfera, o F.C e de diluição na Tabela 1, gerando os seguintes resultados: massa da esfera (g), [Au] (mol/L), massa total (g/L), número de nanopartículas e concentração de nanopartículas (mol/L).

Para determinar a taxa de ligação da GSH foi realizado o ensaio colorimétrico por Folin Ciocalteu, que se baseia na interação de substâncias redutoras com o reagente Folin Ciocalteu (BERKER et al., 2013). A análise foi realizada em uma microplaca de 96 poços. Uma curva padrão foi gerada com uma solução de GSH de concentração conhecida de 19 mM e o pH ajustado para 9. Para análise das amostras, na mesma placa, foi utilizada uma solução saturada de Na₂CO₃ 10%, ácido gálico a 0,2mg/mL e metanol. Em seguida, a placa foi incubada por 20 minutos em temperatura ambiente e protegida da luz direta. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro de microplaca UV/VIS (Varioskan LUX – Thermo Scientific) a 760nm. O número de moléculas de GSH por nanopartícula de ouro foi

obtido por meio de um cálculo matemático (Anexo 1) que relaciona a área e o volume da esfera com o volume e o diâmetro da GSH.

O imageamento demonstrando a forma e tamanho das nanopartículas foi analisado por microscopia eletrônica de transmissão (Microscópio Eletrônico de Transmissão (TEM) Tecnai G2-12 – FEI SpiritBiotwin 120kV) no Centro de Microscopia da UFMG. Para determinação de seus tamanhos e a geração de histogramas de distribuição dos tamanhos foram utilizadas 10 imagens, totalizando 363 nanoesferas do grupo AuNP e 481 do grupo GSH-AuNP analisadas, obtidas no TEM e tratadas no programa Image J (NIH/USA).

3.4 Animais

Foram utilizados camundongos machos CD1 de 11 a 14 semanas de idade provenientes do Biotério Central da UFMG. Eles foram alocados em gaiolas no Biotério de Experimentação exclusivo para camundongos, do Departamento de Fisiologia e Biofísica da UFMG, onde receberam alimentação com ração balanceada padrão (Nuvilab®) e água *ad libitum* em temperatura controlada de +/- 25°C e foto período de 12h claro/escuro. Todos os experimentos foram realizados após aprovação do protocolo experimental pela Comissão de Ética no Uso de Animais pelo número CEUA: 270/2021 (certificado em anexo).

3.5 Preparação do tecido cerebral

Os animais foram eutanasiados rapidamente por deslocamento cervical, o cérebro foi retirado, colocado em uma solução de ACSF (Fluido Cerebro-Espinal Artificial) pré-incubação (Tabela 3), a 4°C, previamente aerada com uma mistura carbogênica de 95% O₂ e 5% CO₂. Em seguida, o hipocampo foi dissecado em uma placa de Petri invertida em uma superfície gelada e fatiado na espessura de 400 μ m usando um fatiador de tecidos (Mcllwain™ Brinkmann Instruments).

3.6 Privação de oxigênio e glicose (OGD) – modelo de dano isquêmico *in vitro*

As fatias hipocampais foram separadas aleatoriamente em dois grupos: 1) controle (nOGD), que não passou pela privação, e 2) isquemia (OGD), que passou pela privação; e colocadas em poços contendo 500 μ l de solução ACSF pré-

incubação, aeradas com mistura carbogênica de 95% O₂ e 5% CO₂ e incubadas a 33°C por dois períodos de 45 minutos para troca dos meios.

Após o período de pré-incubação, os meios foram retirados e descartados. Na placa nOGD foi colocado ACSF com glicose e aerado com mistura carbogênica de 95% O₂ e 5% CO₂ (Tabela 3), enquanto a placa OGD continha ACSF sem glicose e aerada com mistura gasosa contendo 95% N₂ e 5% CO₂ (Tabela 3). Em ambas as placas, as fatias foram separadas em grupos controle e grupos tratamento com Glutathione livre, nanopartículas de ouro controle (AuNP) nas concentrações de 100µg/mL e 800µg/L, respectivamente. Foi gerada uma curva concentração x resposta de nanopartículas de ouro com GSH (GSH- AuNP) nas concentrações de 0,08µg/L, 0,8µg/L, 8µg/L, 80µg/L e 800µg/L, diluídas em 500uL de ACSF com ou sem glicose. Todas as placas foram incubadas por 60 minutos em suas respectivas condições experimentais (GROMNICOVA et al., 2013; ZHENG et al., 2019b). Em seguida, os meios foram retirados e coletados em tubos tipo eppendorf de 500½l, substituídos por ACSF contendo glicose e aerados novamente com mistura carbogênica. As placas foram incubadas por mais 120 minutos, durante o período de reperfusão.

Com o término do período de reperfusão, os meios foram coletados e armazenados em tubos do tipo eppendorf. Em seguida, a liberação de lactato desidrogenase (LDH) foi medida, para avaliar o dano celular e a liberação de glutamato, para avaliar a excitotoxicidade; o tecido foi retirado dos poços com solução ACSF com glicose e congelado para posterior dosagem de proteínas e normalização (Figura 14).

As soluções-mãe dos tratamentos foram preparadas com água para injeção como veículo. No dia do experimento de OGD foram feitas diluições com ACSF com/sem glicose.

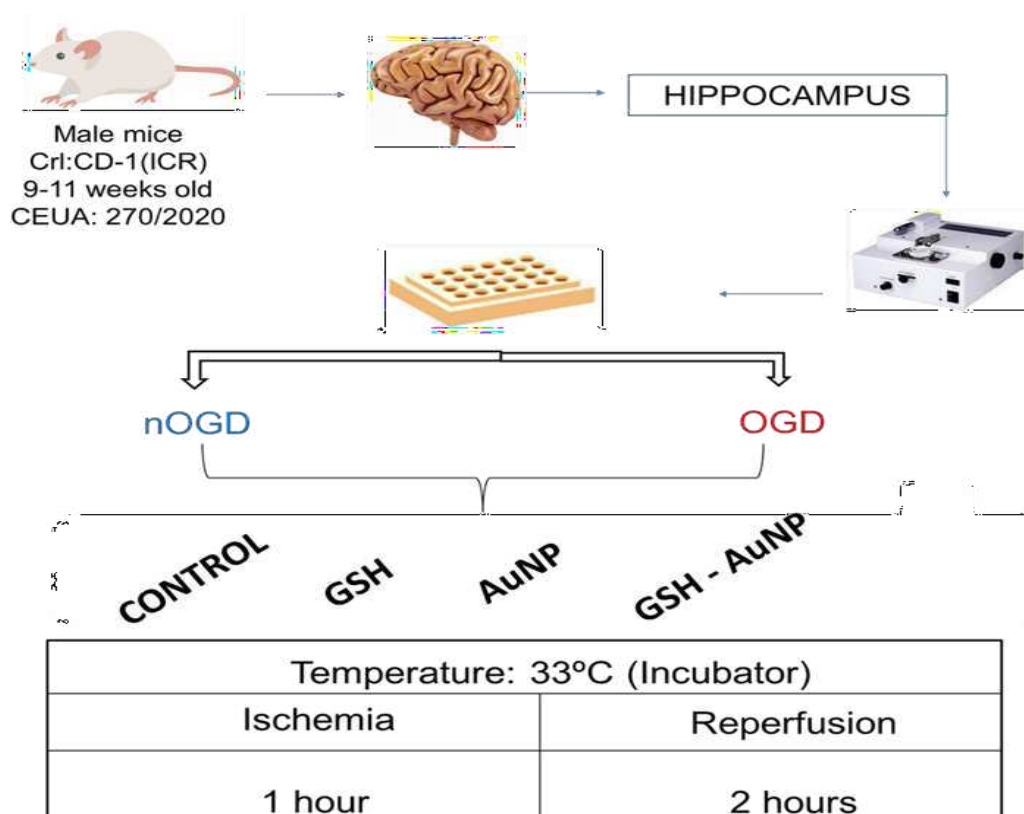
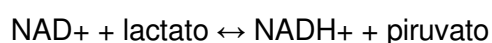


Figura 14: Delineamento experimental do modelo de privação de oxigênio e glicose. Camundongos machos CD1 são eutanasiados por deslocamento cervical, o hipocampo é retirado e fatiado a 400µm em um chopper. As fatias são separadas nas placas nOGD e OGD e os grupos GSH livre, AuNP e GSH-AuNP são criadas. O grupo OGD permanece por 1 hora em período de isquemia, em que é aerado com mistura gasosa (95% N₂ e 5% CO₂) e não recebe glicose, enquanto a placa nOGD é aerada com mistura carbogênica (95% O₂ e 5% CO₂) e recebe glicose. Após este período, os meios são retirados e substituídos, então começa o período de reperfusão, que dura 2 horas, em que ambos os grupos são aerados com mistura carbogênica (95% O₂ e 5% CO₂) e recebem glicose. Os meios e tecidos são retirados para posteriores análises.

3.7 Ensaio para quantificação de lactato desidrogenase liberada

Para determinação do dano celular foi utilizado o ensaio de lactato desidrogenase. O LDH é uma enzima citosólica, encontrada entre os organismos vertebrados, que faz parte do metabolismo glicossítico, sendo responsável pela formação de lactato quando em situação de falta de oxigênio. Ela catalisa a oxidação de nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido (NADH) com piruvato ou reduz dinucleótido de nicotinamida e adenina (NAD) e lactato por meio da seguinte reação colorimétrica (MARKERT, 1984a).



O ensaio de citotoxicidade foi realizado com o kit LDH (Bioclin, Brasil) em que foram utilizados 8½l do sobrenadante dos grupos controle e isquemia, coletados durante os períodos de isquemia e reperfusão, para determinação da concentração catalítica, em uma leitura cinética, a uma absorbância de 340nm, conforme descrito no kit. Foi utilizada uma placa de 96 poços. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Multiskan GO). A normalização foi realizada por meio da quantificação de proteínas totais das amostras das fatias hipocâmpais previamente homogeneizada (BRADFORD, 1976a).

3.8 Ensaio para quantificação de glutamato liberado

A liberação de glutamato no sobrenadante das amostras é mensurada por meio da reação entre NAD⁺ e glutamato desidrogenase (GDH), resultando no aumento da fluorescência pela produção de NADH⁺ (NICHOLLS; SIHRA; SANCHEZ-PRIETO, 1987). O ensaio foi realizado em solução KRH (solução de Krebs-Henseilt) (32 uL) com a adição de 10 uL de NADP⁺ (40nM) e 150 uL de amostra incubado a 37°C. Quando esta solução é excitada por uma luz em um comprimento de onda de 340 nm, emite uma fluorescência que pode ser detectada e quantificada em um comprimento de onda de 440 nm por um fluorímetro (Synergy 2) (LEITE et al., 2012; MASSENSINI et al., 1998; NICHOLLS; SIHRA; SANCHEZ-PRIETO, 1987).

Em triplicata, o background de fluorescência foi determinado e subtraído dos valores encontrados, por meio da leitura de NADP⁺ e GDH junto ao tampão KRH. Para a quantificação final e criação de uma curva padrão, foram utilizados 2 uL de um padrão interno de glutamato (2 nmol/uL), como referência. A normalização foi realizada por meio da quantificação de proteínas totais das amostras das fatias hipocâmpais previamente homogeneizadas (BRADFORD, 1976a).

3.9 Ensaios para quantificação da atividade de caspases

3.9.1 Quantificação da atividade de caspase-3

Para a quantificação da atividade de caspase-3, utilizou-se o Kit *EnzChek®Caspase-3 Assay Kit #2* (MOLECULAR PROBES), cujo ensaio consiste da utilização do substrato Z-DEVD-AMC, composto por 7-amino- 4-metilcumarim (AMC) e um peptídeo sintético, Asp-Glu-Val-Asp (DEVD), que corresponde a um dos

sítios de clivagem da caspase-3. Na presença da protease, o substrato é clivado liberando o radical AMC, que pode ser quantificado fluorimetricamente em comprimentos de onda de 340-350nm de excitação e 440-460nm de emissão.

Para a realização do ensaio, em uma placa de 96 poços, 200µl de amostra (equivalente a 200µg de proteína) foram adicionados a 50µl da solução de reação, composta pelo substrato Z-DEVD-AMC (10mM) e pela solução tampão 2x (50mM PIPES pH=7,4, 10mM EDTA, 0,5% CHAPS, 1M DTT e dH₂O). A placa foi mantida protegida da luz, a temperatura ambiente e após 30 minutos foi levada ao espectrofluorímetro (modelo: Multiskan GO) para a realização da leitura (excitação ~496 nm, emissão 520 nm). O experimento foi realizado em duplicata e o background de fluorescência determinado e subtraído dos valores encontrados por meio da leitura de 50 ½L de tampão de lise somados à 50 ½L de solução tampão 2x com o substrato.

Para a quantificação do AMC liberado, uma curva padrão foi preparada a partir de uma diluição seriada, de concentrações entre 0 a 25½M de AMC, em solução tampão 1x (50mM PIPES pH=7,4, 10mM EDTA, 0,5% CHAPS, 1M DTT e dH₂O). A normalização final foi realizada por meio da dosagem de proteínas totais das amostras (BRADFORD, 1976a).

3.9.2 Quantificação da atividade de caspase-9

Para a quantificação da atividade de caspase-9 utilizou-se o Kit *Caspase-9 Colorimetric Protease Assay* (BIOVISION), cujo ensaio consiste na utilização do substrato LEHD-*p*NA, composto por um cromóforo, *p*-nitroanilide (*p*-NA) e um tetrapeptídeo sintético, Leu-Glu-His- Asp (IETD), que corresponde a um dos sítios de clivagem da caspase-9, precursor de caspase-3 inativa. Na presença da protease o substrato é clivado liberando o radical *p*-NA. A absorção de luz pelo *p*-NA pode ser quantificada por espectrofotometria em comprimentos de onda de 400- 405nm.

Para a realização do ensaio, alíquotas contendo volumes com concentrações de 200½g de proteína, determinados pelo método de Bradford, foram adicionadas a 50 ½L de solução tampão 2x (tampão salina, glicerol e detergente; 10 mM DTT adicionado na hora). Ao final, acrescentou-se 5½L do substrato LEHD-*p*NA (4mM). A reação foi mantida protegida da luz, a 37°C e, após 2 horas, foi levada a um espectrofluorímetro (modelo: Multiskan GO) para a realização da leitura (Abs.: 400 nm). O experimento foi realizado em duplicata e o background foi determinado e

subtraído dos valores encontrados na leitura de 50 $\frac{1}{2}$ L de tampão de lise, somados de 50 $\frac{1}{2}$ L de solução tampão 2x e 5 $\frac{1}{2}$ L substrato. A análise do resultado foi feita comparando o nOGD controle com os outros grupos. A normalização final foi realizada pela dosagem de proteínas totais das amostras (BRADFORD, 1976a).

3.10 Dosagem de proteínas

Para dosagem das proteínas foi utilizada solução de Bradford. O ensaio colorimétrico é determinado pela ligação do Coomassie Brilliant Blue G-250 à proteína. A ligação do corante à proteína causa uma mudança na absorção máxima do corante na faixa de 465nm a 595nm (BRADFORD, 1976a). O aumento da absorção a 595 nm foi monitorado e avaliado no espectrofotômetro (Multiskan GO).

3.11 Análise estatística

Para as análises estatísticas utilizou-se o teste de Two-way ANOVA, Tukey post-hoc e o nível de significância estabelecido foi de $p < 0,05$. O programa utilizado para as análises estatísticas e elaboração dos gráficos foi o GraphPadPrism 8[®]. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

3.12 Biodistribuição

Foram utilizadas as soluções de AuNP e nanocomplexo descritas nos tópicos 2.1 e 2.2 diluídas em solução salina estéril (0,9%) e administradas de modo intravenoso na veia da cauda dos animais descritos no tópico 2.4, em uma dose de 1mg/kg de peso corporal. Assim, os grupos controle (salina estéril), AuNP e nanocomplexo foram criados. As injeções foram realizadas sob anestesia gasosa leve com isoflurano para minimizar o estresse, onde o animal foi colocado em um aparato de contenção. Os camundongos foram sacrificados 24h após a injeção. Para isso, os animais foram perfundidos. O cérebro, o fígado e o rim foram retirados para análise da concentração de ouro. Os órgãos foram colocados em tubos do tipo eppendorf, sendo logo em seguida liofilizados e pesados.

Para digestão das proteínas e lipídeos dos órgãos, 50 mg de tecido foram pesados e colocados em tubos do tipo eppendorf que continham solução de ácido nítrico. 24h depois, os tecidos foram colocados em um banho-maria a 60°C por 30 minutos. Após este período, foi adicionada uma solução de H₂O₂ para que a reação

de lise lipídica fosse finalizada. Nesta etapa, as amostras voltaram para o banho-maria a 60°C por mais 30 minutos. No final deste processo, observa-se uma solução clara amarelada, resultado da digestão.

Após estes passos, as amostras foram lidas no Espectrômetro de massa com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS/MS 8800 da Agilent). Para esta leitura, as amostras foram transferidas para tubos do tipo falcon e seu volume completado para 3 mL. A análise foi realizada a partir da seguinte equação:

$$\frac{\text{Concentração de ouro [ppb]} \times \text{volume final}}{\text{massa do órgão (g)}} \quad (\text{mL})$$

Onde o resultado foi dado em ppb/g. Para as análises estatísticas do fígado e do rim utilizou-se o teste de Ordinary One-way ANOVA, com Tukey post-hoc e o nível de significância estabelecido de $p < 0,05$. Para as análises das estruturas cerebrais, utilizou-se o teste de Two-way ANOVA, com Tukey post-hoc e o nível de significância estabelecido de $p < 0,05$. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

Tabela 2: Lista de equipamentos utilizados nos experimentos

Nome	Modelo / Marca
Balança eletrônica com precisão decimal	BG 440 / Gehaka ^{LTDA}
Agitador	TE – 089 / Tecnai [®]
Banho maria com agitação	BT-25 / Yamato ^{LTDA}
Centrífuga	5415 R / Eppendorf
Espectrofotômetro	Multiskan GO / Thermo Fisher Scientific
Fatiador de tecidos	Tissue chopper / Mcllwain TM Brinkmann Instruments, England
pHmetro digital	PG1800 / Gehaka ^{LTDA}
Espectrofluorímetro	Synergy 2 / Biotek [®]
Leitor híbrido multi-modal	Cytation 5 Cell Imaging / Biotek
Homogeneizador de tecidos	z359971-1EA / Sigma-Aldrich [®]

Espectrofotômetro UV-VIS	Varioskan LUX / Thermo Scientific
Zetasizer	Nano – ZS90 / Malvern
Ultrassom	SONICS Vibra cell VCX 500
Espectrofotômetro	Shimadzu UV3600
Microscópio Eletrônico de Transmissão	Tecnai G2-12 – FEI SpiritBiotwin 120kV
ICP-MS	ICP-MS/MS 8800 da Agilent
Ultracentrífuga	Sorvall® Ultra PRO 80 – DU PONT

Tabela 3: Lista de soluções utilizadas nos experimentos

Solução	Composição (mM)
ACSF Pré-incubação	Cloreto de Sódio (NaCl) – 120 Cloreto de Potássio (KCl) – 2 Fosfato Ácido de Potássio (KH₂PO₄) – 1,18 Sulfato de Magnésio (MgSO₄) – 10 Cloreto de Cálcio (CaCl₂) – 0,5 Bicarbonato de Sódio (NaHCO₃) – 26 Glicose – 11 pH = 7,4 ajustado com HCl 3M H₂O Volume = 1L
ACSF com glicose	Cloreto de Sódio (NaCl) – 120 Cloreto de Potássio (KCl) – 2 Fosfato Ácido de Potássio (KH₂PO₄) – 1,18 Sulfato de Magnésio (MgSO₄) – 1,19 Cloreto de Cálcio (CaCl₂) – 2 Bicarbonato de Sódio (NaHCO₃) – 26 Glicose – 11 pH = 7,4 ajustado com HCl 3M H₂O Volume = 1L
ACSF sem glicose	Cloreto de Sódio (NaCl) – 120 Cloreto de Potássio (KCl) – 2

	Fosfato Ácido de Potássio $(\text{KH}_2\text{PO}_4) - 1,18$ Sulfato de Magnésio $(\text{MgSO}_4) - 1,19$ Cloreto de Cálcio $(\text{CaCl}_2) - 2$ Bicarbonato de Sódio $(\text{NaHCO}_3) - 26$ pH = 7,4 ajustado com HCl 3M H ₂ O _d Volume = 1L
BSA	Soro de albumina bovina (1mg/mL) H ₂ O _d
Bradford	Azul de Coomassie – 0,05g Metanol – 0,05L Ácido fosfórico – 0,1L H ₂ O _d Volume = 1L
KREBS-RINGER-HEPES (KRH)	NaCl – 124 KCl – 4 MgSO ₄ – 1,2 Glicose – 10 HEPES – 25 H ₂ O _d pH = 7,4 ajustado com NaOH 10M Volume = 0,1L
Glutamato padrão	Ácido glutâmico – 6 H ₂ O _d
NADP⁺	NADP ⁺ – 600 H ₂ O _d
Nanopartículas de ouro	HAuCl ₄ – 25 NaBH ₄ – 250 ph = 8 ajustado com NaOH 1M

Nanopartículas de ouro com glutathione	HAuCl ₄ – 25 NaBH ₄ – 250 Glutathione – 19 ph = 8 ajustado com NaOH 1M
Na₂CO₃ saturada	Na ₂ CO ₃ – 900 Volume = 0,1L
Ácido gálico	C ₇ H ₆ O ₅ – 5000 Volume = 0,001L
NaOH	NaOH – 1000 H ₂ O

Tabela 4: Lista de reagentes utilizados nos experimentos

Reagentes	Código-Fabricante
Kit LDH	Quibasa - Bioclin
Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina hidratado (NADP⁺)	N1511 - Sigma Aldrich®
Glutamato Desidrogenase	G2626 - Sigma Aldrich®
Ácido glutâmico	G1251 – Sigma Aldrich®
Glutathione	G4251 - Sigma Aldrich®
NaBH₄	452890 - Sigma Aldrich®
HAuCl₄	484350 - Sigma Aldrich®
Caspase-3	EnzChek®Caspase-3 Assay Kit #2 – MOLECULAR PROBES
Caspase-9	Caspase-9 Colorimetric Protease Assay – BIOVISION

<Um especialista é uma pessoa que cometeu todos os erros que podem ser cometidos em um campo muito restrito.=

Niels Bohr

Prêmio Nobel de Física, 1922

4 RESULTADOS

4.1 Síntese e caracterização das nanopartículas

4.1.1 Síntese

As nanopartículas de ouro biofuncionalizadas com glutatona (GSH- AuNP) foram sintetizadas (Figura 12) a partir do protocolo de Chai e colaboradores (CHAI et al., 2010b). Para a produção das AuNP controle, foi utilizado o mesmo protocolo, porém, com a ausência da GSH (Figura 13). Uma vez sintetizadas, as duas soluções de AuNP foram analisadas quanto a sua forma, carga e tamanho.

4.1.2 Caracterização quanto a forma das nanopartículas

Analisando as soluções, foi observado que as AuNP apresentaram $\lambda_{\text{máx}}$ de 530nm, enquanto as GSH-AuNP apresentaram 520nm (Figura 15).

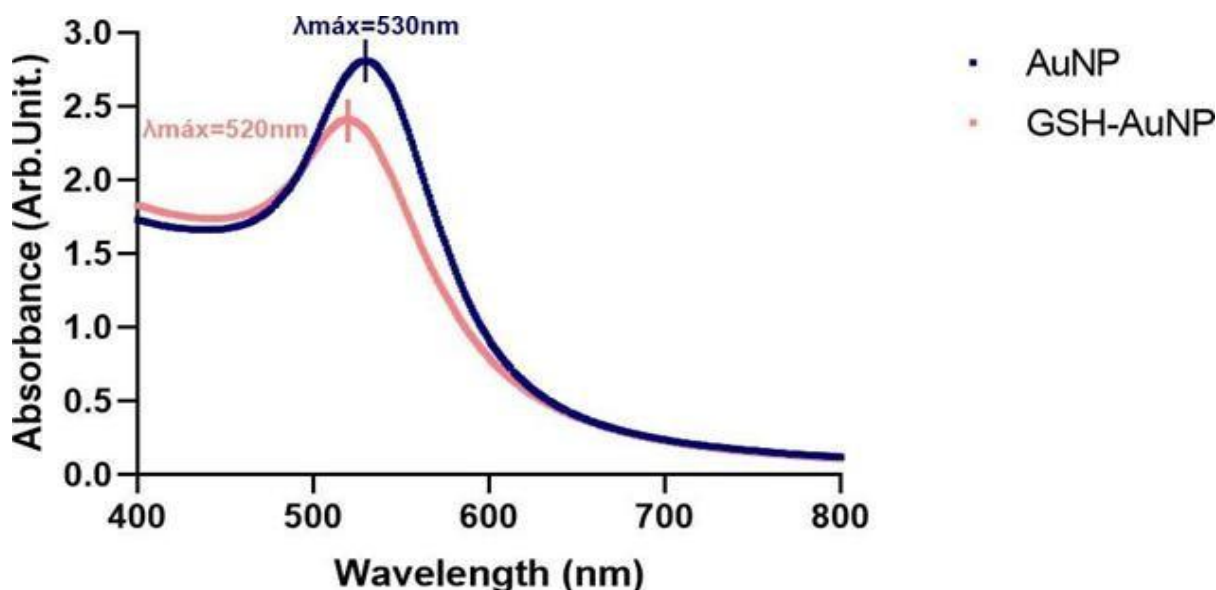


Figura 15: Gráfico da caracterização da forma das AuNP e GSH-AuNP por espectroscopia de absorvância UV-Vis. O gráfico mostra o espectro de absorvância das AuNP (na cor azul) e das GSH-AuNP (na cor salmão, onde no eixo y está a absorvância em unidades arbitrárias e no eixo x estão os comprimentos de onda de 400nm a 800nm). A mudança no pico máximo de absorção (AuNP = 530nm e GSH- AuNP = 520nm) indica uma mudança na Ressonância Plasmônica de Absorção causada pela modificação da superfície da nanoesfera, uma vez que este ensaio é feito por meio do espalhamento de luz. Os valores estão representados pela média $\pm$ desvio padrão. n=3

4.1.3 Caracterização quanto a carga das nanopartículas

O potencial Zeta, que indica a carga superficial detectada, foi analisado, e as AuNP apresentaram carga de -31,4mV, enquanto a GSH-AuNP de -27mV (Figura 16).

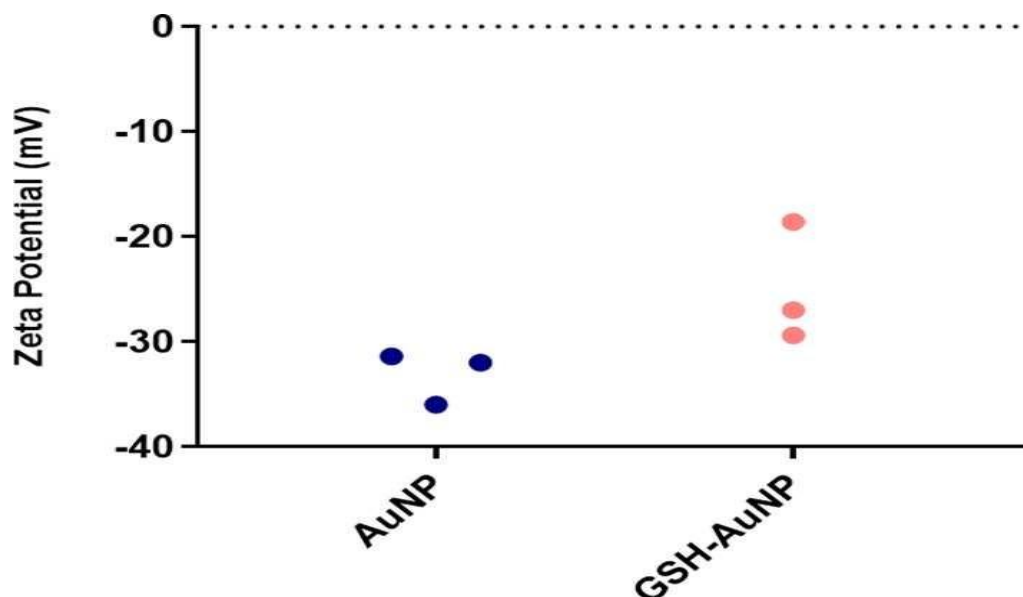


Figura 16: Gráfico da caracterização do potencial zeta (mV) das AuNP e GSH-AuNP analisado no ZetaSizer. O gráfico mostra os valores do potencial zeta (carga) das AuNP (na cor azul) e das GSH-AuNP (na cor salmão), onde no eixo y está o potencial zeta em mV e no eixo x os grupos avaliados. A mudança na carga indica modificação na superfície das nanopartículas, demonstrando sua funcionalização. n=3

4.1.4 Caracterização quanto o tamanho e formato das nanopartículas

Por meio de microscopia eletrônica de transmissão, foi observado que as nanopartículas apresentavam formato esférico (Figura 17A, C). Analisando as imagens de microscopia, usando programa Image J, também foi possível gerar histogramas de distribuição de tamanhos, onde foi observado que tanto as AuNP quanto as GSH-AuNP (Figura 17B, D) apresentaram uma média de tamanho de 6 nm.

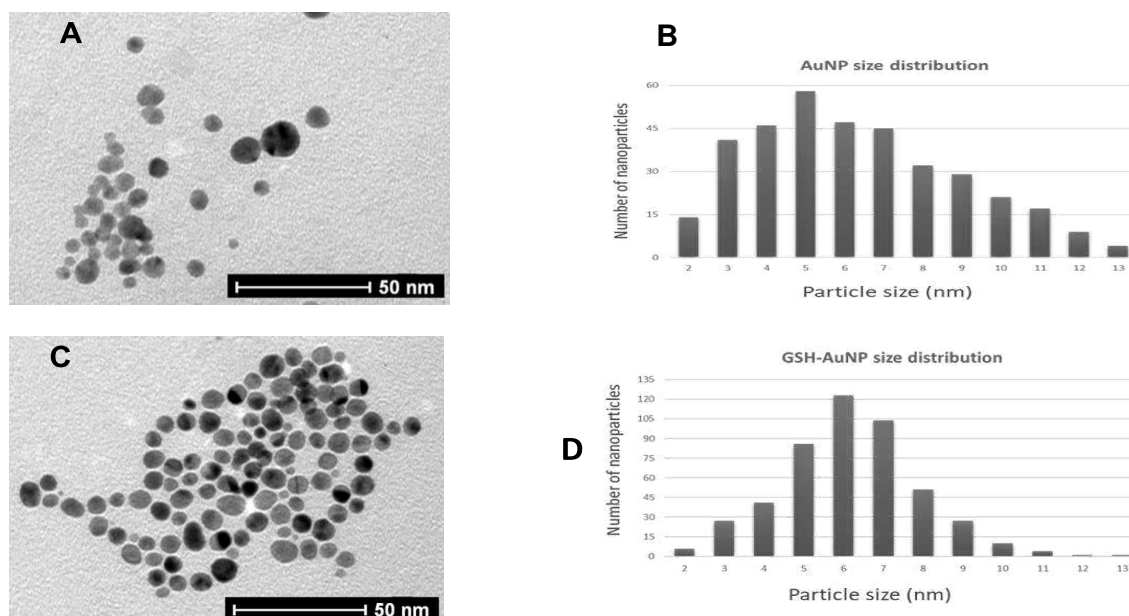


Figura 17: Caracterização do tamanho das AuNP e GSH-AuNP por microscopia eletrônica de transmissão (TEM). **A)** imagem das AuNP (escala=50nm); **B)** histograma de distribuição dos tamanhos das AuNP obtidas pelo imageamento no TEM por meio de análise no programa Image J. Foram analisadas 363 nanopartículas; **C)** imagem das GSH-AuNP (escala=50nm); **D)** histograma de distribuição dos tamanhos das GSH-AuNP obtidas pelo imageamento no TEM por meio de análise no programa Image J.

4.1.5 Caracterização quanto a taxa de ligação da glutatona

A taxa de ligação de GSH às nanopartículas e sua concentração foram determinadas na solução final. O ensaio de Folin-Ciocalteu indicou uma concentração de 1,38 mg/ml de GSH. Sabendo que inicialmente foram adicionados 0,0454g de GSH em um volume final de 30 ml, o que equivale a uma concentração teórica de 1,51 mg/ml, podemos calcular a taxa de recuperação da glutatona. A concentração medida de 1,38 mg/ml reflete uma perda de GSH, possivelmente devido às centrifugações ou à não ligação às nanopartículas de ouro, resultando em uma taxa de ligação de 92,5%. (Tabela 5).

Tabela 5: Taxa de ligação da glutatona às nanopartículas em porcentagem. A Tabela mostra uma alta taxa de ligação de glutatona nas nanoesferas, 92,5%, e concentração de glutatona de 1,38mg/mL analisada por ensaio do Folin Ciocalteu. A quantificação é realizada no sobrenadante, subtraída da quantidade inicial adicionada na síntese e transformada em porcentagem.

TAXA DE LIGAÇÃO DA GLUTATONA (%)	
Sobrenadante AuNP +GSH	92,5 (1.38mg/mL)
Concentração de GSH	

Também foi realizado um cálculo teórico levando em consideração a área, o volume e o raio da esfera, assim como a massa molar e densidade do ouro, massa molar do HAuCl_4 e da GSH. Com estas contas, é possível determinar a quantidade teórica de moléculas de GSH que se ligam a uma nanopartícula (Anexo 1). A partir do cálculo pudemos obter 190 moléculas por AuNP, e considerando a taxa de 92,5% de ligação obtida no ensaio do Folin Ciocalteu, teoricamente teriam 175 moléculas de GSH por AuNP.

4.1.6 Caracterização quanto a concentração de nanopartículas

Por último, a partir da densidade óptica determinada na espectroscopia de absorvância e do raio das nanopartículas (Tabela 1), também foi analisada a concentração de nanopartículas em ambas as soluções. Foi observado 82mg/L de AuNP na solução controle (Tabela 6A) e 44mg/L na solução funcionalizada (Tabela 6B). Esta diminuição pode ter ocorrido pela necessidade de centrifugar a solução funcionalizada para que a GSH livre fosse retirada. A partir dos dados de concentração de nanopartículas, pudemos fazer diluições e gerar as novas concentrações para serem analisadas no modelo de privação de oxigênio e glicose.

Tabela 6: Quantificação de ouro e nanopartículas nas soluções de AuNP e GSH-AuNP.

A) A Tabela demonstra a massa de uma esfera, [Au], massa total, número de nanopartículas e concentração de nanopartículas na solução de AuNP em 1000mL. **B)** A Tabela demonstra a massa de uma esfera, [Au], massa total, número de nanopartículas e concentração de nanopartículas na solução de GSH-AuNP em 1000mL.

AuNP	Em 1000 mL
Massa de 1 esfera	2.18×10^{-18}
[Au] na solução	$4.17 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$
Massa total	0.082g
Número de nanopartículas	3.77×10^{16}
Concentração de nanopartículas	$6.25 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$

A

GSH-AuNP	Em 1000 mL
Massa de 1 esfera	2.18×10^{-18}
[Au] na solução	$2.21 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$
Massa total	0.044g
Número de nanopartículas	2×10^{16}
Concentração de nanopartículas	$3.32 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$

B

4.2 Tratamento da isquemia cerebral no período da isquemia

4.2.1 Análise do dano celular

Para avaliação do dano celular causado pelo modelo de privação de oxigênio e glicose e consequente neuroproteção hipocampal dos grupos com os tratamentos, foi realizado o ensaio de liberação de LDH. Os grupos GSH livre, AuNP e GSH-AuNP foram analisados e posteriormente, uma curva concentração x resposta do grupo GSH-AuNP foi gerada para melhor compreensão de seus efeitos.

No gráfico apresentado na Figura 18, em que o eixo x representa os grupos que passaram pelas condições escolhidas (sem / com isquemia; sem / tratamento) e o eixo y representa a liberação de LDH em U/g de proteína, primeiramente pode ser analisada a primeira condição: submissão ou não ao protocolo de isquemia. Ao longo de toda a apresentação estes dados serão representados da seguinte maneira: as barras que representam o grupo nOGD estarão em lilás e as barras em rosa são os grupos OGD. Os grupos que passaram pela privação foram chamados de OGD e os que não passaram, nOGD. Como mostrado na Figura 18, quando analisado o grupo que passou pela privação de oxigênio e glicose (OGD controle), comparando com o grupo nOGD controle, pode ser observada maior liberação de LDH [$F(1, 160) = 127,8$; $p < 0,0001$].

Com o intuito de determinar a concentração de GSH-AuNP com melhor efeito, foi gerada uma curva concentração x resposta, englobando as concentrações de 0,08 $\mu\text{g/L}$, 0,8 $\mu\text{g/L}$, 8 $\mu\text{g/L}$, 80 $\mu\text{g/L}$ e 800 $\mu\text{g/L}$. Não foi observada toxicidade em nenhum dos grupos tratamento, o que pode ser visto comparando-se os grupos nOGD tratamento com nOGD controle no gráfico. Quando avaliada a condição tratamento, somente o grupo OGD que recebeu a concentração de 0,8 $\mu\text{g/L}$ foi capaz de gerar uma liberação de LDH estatisticamente menor que o grupo OGD [$F(8,160) = 36,32$; ($p = 0,0011$)]. Este grupo mostrou proteção contra os danos causados pelo protocolo. As outras concentrações não mostraram diferença estatística quando comparados no protocolo isquêmico.

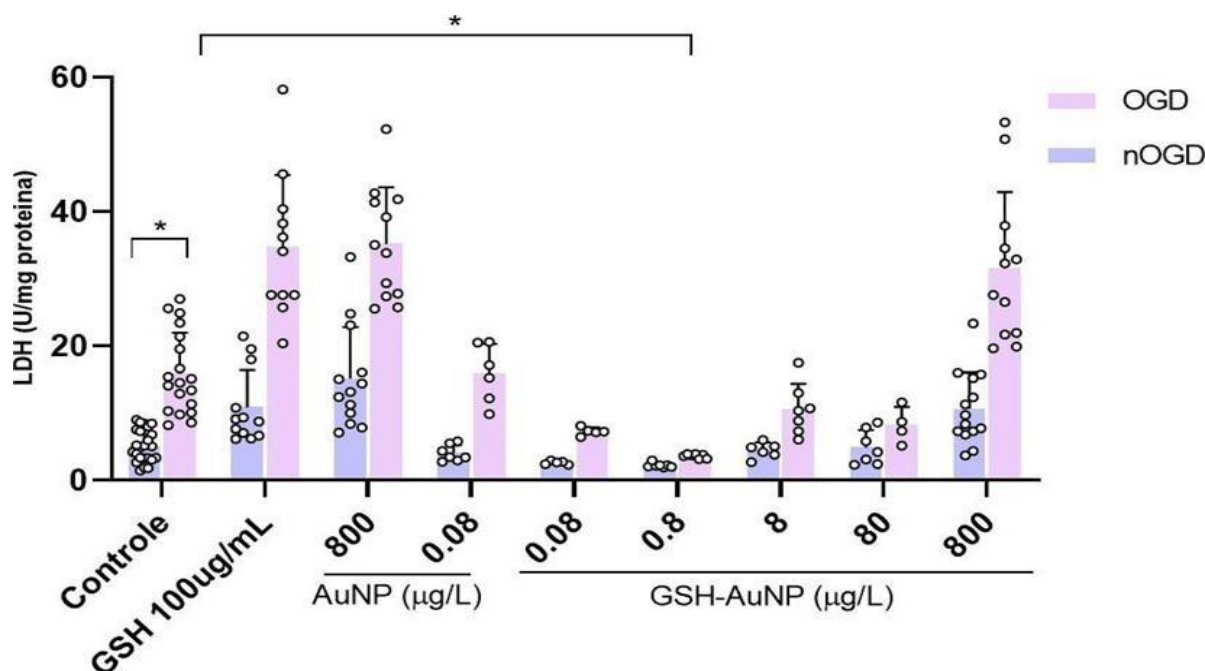


Figura 18: Efeitos dos grupos tratamento no dano celular em fatias hipocâmpais submetidas ao modelo de privação de oxigênio e glicose. O gráfico mostra a liberação de lactato desidrogenase (LDH), uma medida indireta de dano celular em U/mg de proteína, durante o período de isquemia no modelo de isquemia *in vitro*. Foram usadas a GSH livre, AuNP (0,08 µg/L e 800 µg/L) e gerada uma curva concentração x resposta com a GSH-AuNP usando as concentrações de 0,08 µg/L, 0,8 µg/L, 8 µg/L, 80 µg/L e 800 µg/L como tratamento para avaliar neuroproteção. O eixo y mostra a liberação de LDH em U/mg de proteína e o eixo x mostra o grupo controle e os grupos tratamentos. Os grupos que não passaram pela privação estão na cor lilás e os que passaram pela privação estão em rosa. Foi observada maior liberação de LDH no grupo controle OGD comparado ao grupo controle nOGD [F (1, 160) = 127,8; $p < 0,0001$]. Nenhuma toxicidade celular foi observada, como pode ser observado comparando os grupos nOGD tratamento com o grupo nOGD controle. Foi observada neuroproteção do grupo OGD tratado com 0,8 µg/L GSH-AuNP, observando-se menor liberação de LDH quando comparados com o grupo controle OGD [F (8,160) = 36,32; ($p = 0,0011$)]. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão. Two-Way ANOVA, post hoc Tukey. $n = 6-13$

4.2.2 Análise da liberação de glutamato

Uma vez analisado o dano celular, uma das primeiras vias deletérias da isquemia foi analisada: a excitotoxicidade glutamatérgica. Após a análise da curva, gerando uma concentração protetora de 0,8 µg/L, o passo seguinte foi avaliar a via de sinalização de glutamato. A interpretação do gráfico mostrado na Figura 19 deve seguir os mesmos parâmetros do anterior com exceção do eixo y, em que é colocada a liberação de glutamato em nmol/mg de proteína. Foi observada uma maior liberação de glutamato no grupo OGD controle quando comparado ao grupo nOGD controle [F (1, 132) = 172,1; $p < 0,0001$]. Não foi observada toxicidade glutamatérgica, que pode ser notado comparando os grupos nOGD tratamento com o grupo nOGD controle. Este achado pode ser explicado pelo fato de que em um

ambiente de homeostasia, e sendo os tratamentos os únicos modificadores, não houve diferença nesta sinalização.

Não foi observada neuroproteção no grupo GSH livre. Quando analisados os efeitos do grupo GSH-AuNP, na concentração de 0,08 $\mu\text{g/L}$ foi observada uma menor liberação de glutamato quando comparado ao grupo OGD controle [F (8, 132) = 12,21; $p=0,0287$], demonstrando neuroproteção. Como a concentração de 0,08 $\mu\text{g/L}$ GSH- AuNP demonstrou proteção, o grupo 0,08 $\mu\text{g/L}$ AuNP foi adicionado para comparação de ações, porém não foi observada proteção. Uma vez observado que a concentração de 0,08 $\mu\text{g/L}$ diminuiu a liberação de glutamato o modelo de isquemia *in vitro*, foi decidido utilizar esta concentração para as próximas análises.

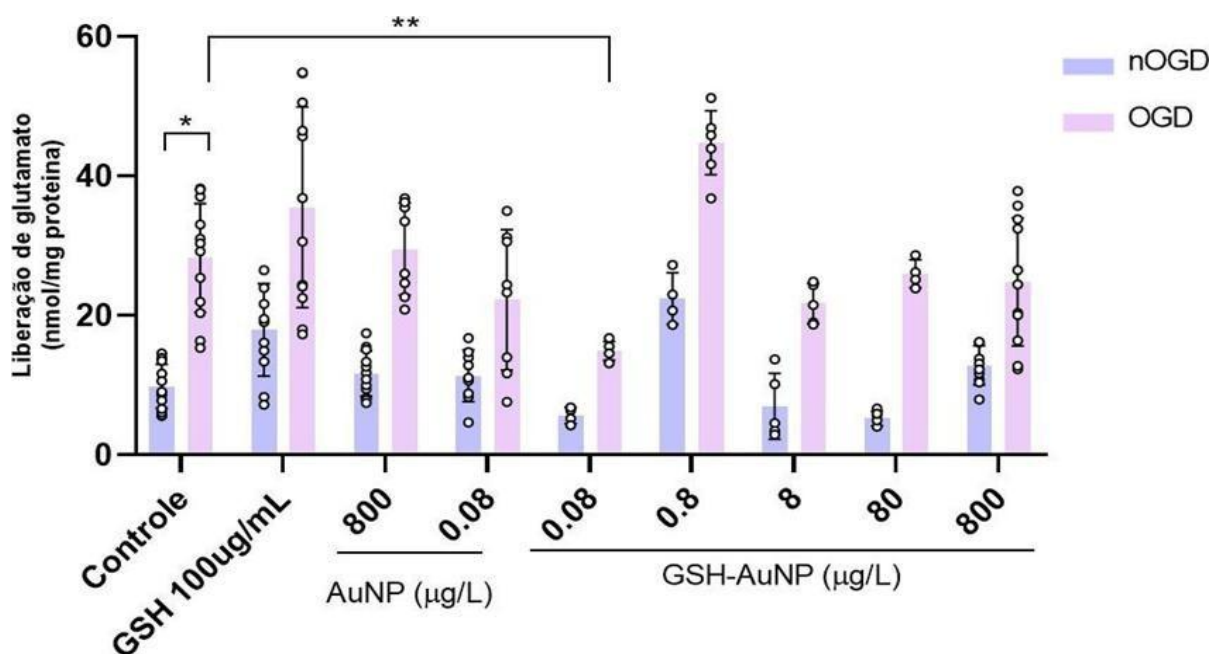


Figura 19: Liberação de glutamato em fatias hipocâmpicas submetidas ao modelo de privação de oxigênio e glicose. O gráfico mostra a liberação de glutamato, em nmol/mg de proteína, durante o período de isquemia no modelo de isquemia *in vitro*. Foram usadas a GSH livre, AuNP (0,08 $\mu\text{g/L}$ e 800 $\mu\text{g/L}$) e gerada uma curva concentração x resposta com a GSH-AuNP usando as concentrações de 0,08 $\mu\text{g/L}$, 0,8 $\mu\text{g/L}$, 8 $\mu\text{g/L}$, 80 $\mu\text{g/L}$ e 800 $\mu\text{g/L}$ como tratamento para avaliar neuroproteção. O eixo y mostra a liberação de glutamato (nmol/mg de proteína) e o eixo x mostra o grupo controle e os grupos tratamentos. Os grupos que não passaram pela privação estão na cor lilás e os que passaram pela privação estão em rosa. Foi observada maior liberação de glutamato no grupo controle OGD comparado ao grupo controle nOGD [F (1, 132) = 172,1; $p < 0,0001$]. Nenhuma toxicidade celular foi observada, como pode ser observado comparando os grupos nOGD tratamento com o grupo nOGD controle. Foi observada menor liberação de glutamato no grupo 0,08 $\mu\text{g/L}$ GSH-AuNP [F (8, 132) = 12,21; $p=0,0287$] comparado ao grupo controle durante o processo isquêmico, demonstrando neuroproteção. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão. Two-Way ANOVA, post hoc Tukey. $n=6-13$

4.3 Tratamento da isquemia cerebral no período da reperfusão

4.3.1 Análise do dano celular

Assim como realizado no período da isquemia, para avaliação do dano celular causado pelo modelo de privação de oxigênio e glicose e consequente neuroproteção hipocampal dos grupos com os tratamentos, foi realizado o ensaio de liberação de LDH na reperusão. Os grupos GSH livre, AuNP e GSH-AuNP foram analisados e posteriormente, uma curva concentração x resposta do grupo GSH-AuNP foi gerada para melhor compreensão de seus efeitos.

No gráfico apresentado na Figura 20, em que o eixo x representa os grupos que passaram pelas condições escolhidas (sem / com isquemia; sem / tratamento) e o eixo y representa a liberação de LDH em U/g de proteína, primeiramente pode ser analisada a primeira condição: submissão ou não ao protocolo de isquemia. Quando analisado o grupo que passou pela privação de oxigênio e glicose (OGD controle), comparando com o grupo nOGD controle, não foi observado aumento de LDH, não sendo possível inferir o dano celular causado pelo modelo isquêmico.

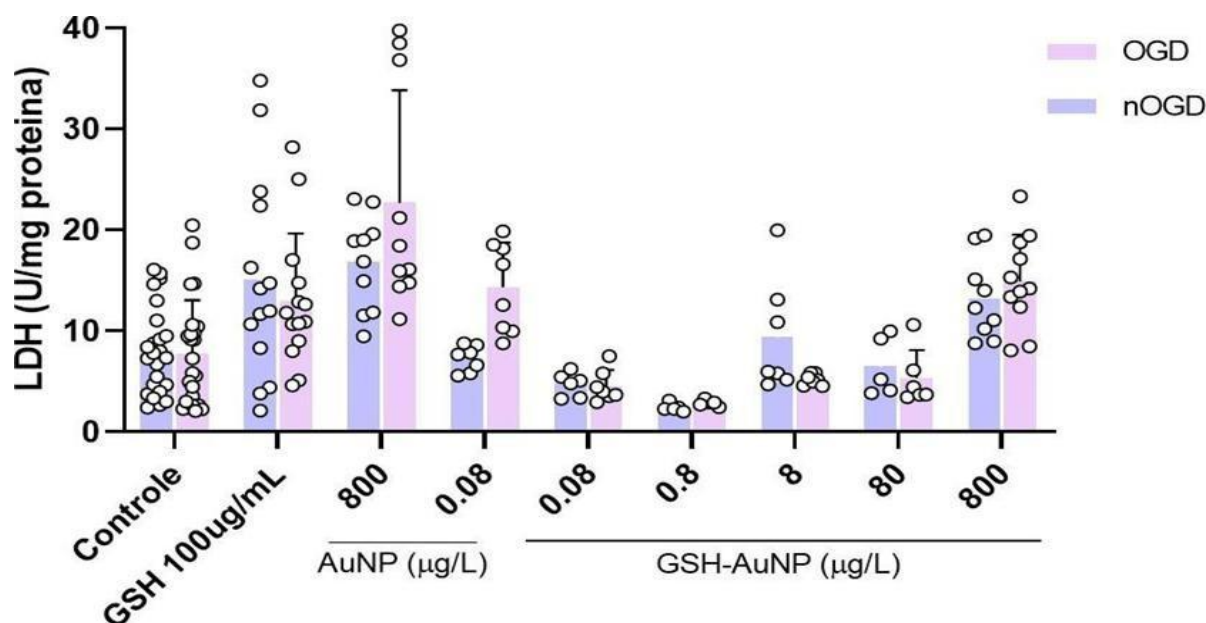


Figura 20: Efeitos dos grupos tratamento no dano celular em fatias hipocampais submetidas ao modelo de privação de oxigênio e glicose na reperusão. O gráfico mostra a liberação de lactato desidrogenase (LDH), uma medida indireta de dano celular em U/mg de proteína, durante o período de isquemia no modelo de isquemia *in vitro*. Foram usadas a GSH livre, AuNP (0,08 µg/L e 800 µg/L) e gerada uma curva concentração x resposta com a GSH-AuNP usando as concentrações de 0,08 µg/L, 0,8 µg/L, 8 µg/L, 80 µg/L e 800 µg/L como tratamento para avaliar neuroproteção. O eixo y mostra a liberação de LDH em U/mg de proteína e o eixo x mostra o grupo controle e os grupos tratamentos. Os grupos que não passaram pela privação estão na cor lilás e os que passaram pela privação estão em rosa. Não foi observada diferença entre os grupos nOGD e OGD controle, assim como não foi observada proteção de nenhum dos grupos tratamento em relação ao dano isquêmico. Os dados são expressos como média ± desvio padrão. Two-Way ANOVA, post hoc Tukey. n=6-13

4.3.2 Análise da atividade de caspases

4.3.2.1 Caspase-3

Para análise da morte celular por atividade de caspase-3, os grupos GSH 100 $\mu\text{g/L}$, AuNP 0,08 $\mu\text{g/L}$ e GSH-AuNP 0,08 $\mu\text{g/L}$ foram escolhidos. Não foi observado aumento da atividade de caspase-3 no grupo OGD controle comparado com o grupo nOGD controle. Com isso, não foi possível observar proteção de nenhum dos grupos tratamento em relação ao dano isquêmico (Figura 21).

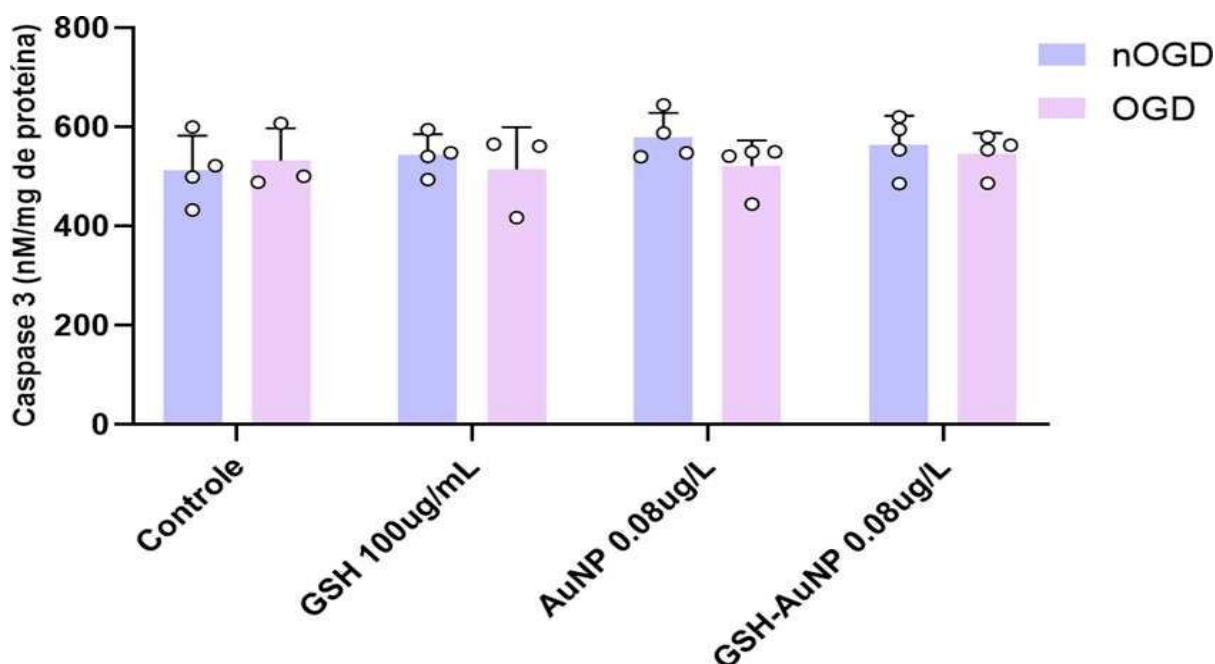


Figura 21: Atividade de Caspase-3 ativa em fatias hipocâmpais submetidas ao modelo de privação de oxigênio e glicose. O gráfico mostra a atividade de caspase-3, em nmol/mg de proteína, durante o período de isquemia no modelo de isquemia *in vitro*. Foram usados os grupos GSH 100 $\mu\text{g/L}$, AuNP 0,08 $\mu\text{g/L}$ e GSH-AuNP 0,08 $\mu\text{g/L}$ como tratamento para avaliar neuroproteção. O eixo y mostra a atividade de caspase-3 (nmol/mg de proteína) e o eixo x mostra o grupo controle e os grupos tratamentos. Os grupos que não passaram pela privação estão na cor lilás e os que passaram pela privação estão em rosa. Não foi observada diferença entre os grupos nOGD e OGD controle, assim como não foi observada proteção de nenhum dos grupos tratamento em relação ao dano isquêmico. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão. Two- Way ANOVA, post hoc Tukey. n=3-4

4.3.2.2 Caspase-9

Para análise da morte celular por atividade de caspase-9, os grupos GSH 100 $\mu\text{g/L}$, AuNP 0,08 $\mu\text{g/L}$ e GSH-AuNP $\mu\text{g/L}$ foram escolhidos. Não foi observado aumento da atividade de caspase-9 no grupo OGD controle comparado com o grupo nOGD controle. Com isso, não foi possível observar proteção de nenhum dos grupos tratamento em relação ao dano isquêmico (Figura 22).

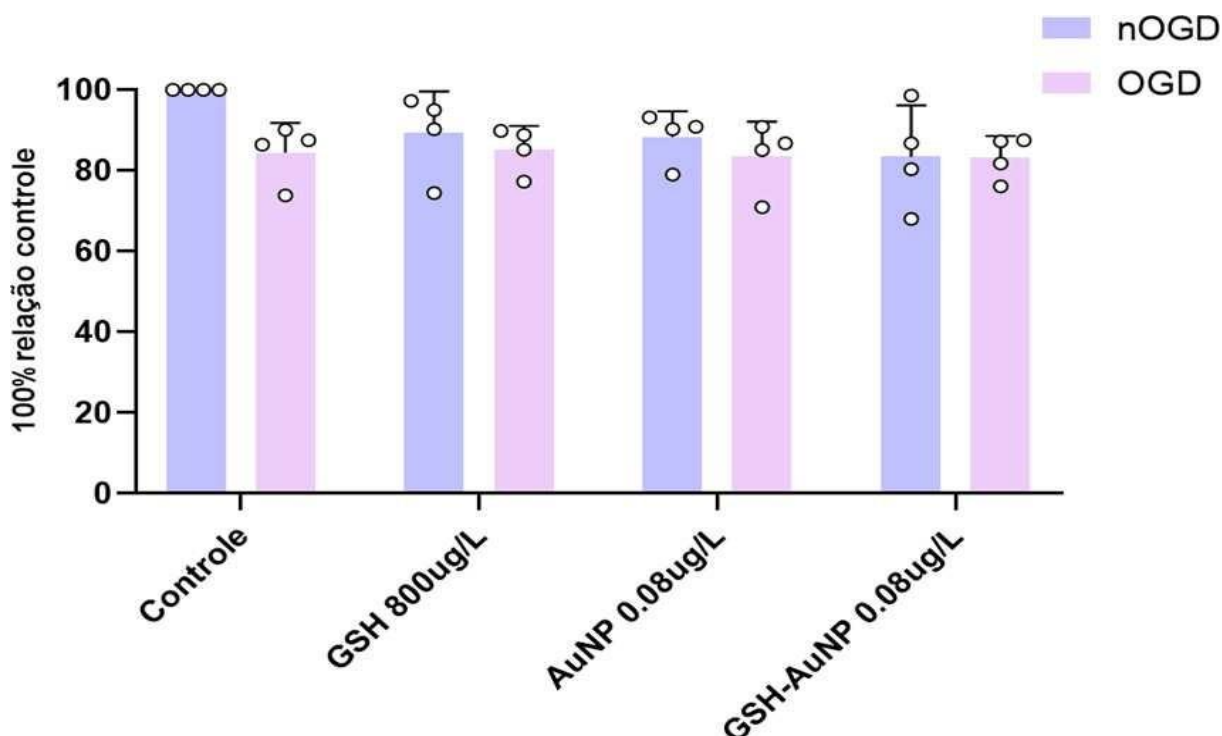


Figura 22: Atividade de Caspase-9 ativa em fatias hipocâmpais submetidas ao modelo de privação de oxigênio e glicose. O gráfico mostra a atividade de caspase- 9, em nmol/mg de proteína, durante o período de isquemia no modelo de isquemia *in vitro*. Foram usados os grupos GSH 100 µg/L, AuNP 0,08 µg/L e GSH-AuNP 0,08 µg/L como tratamento para avaliar neuroproteção. O eixo y mostra a atividade de caspase-9 (% em relação ao controle) e o eixo x mostra o grupo controle e os grupos tratamentos. Os grupos que não passaram pela privação estão na cor lilás e os que passaram pela privação estão em rosa. Não foi observada diferença entre os grupos nOGD e OGD controle, assim como não foi observada proteção de nenhum dos grupos tratamento em relação ao dano isquêmico. Os dados são expressos como média ± desvio padrão. Two- Way ANOVA, post hoc Tukey. n=4

4.4 Biodistribuição

Como último passo, foi avaliada a biodistribuição de ouro para o encéfalo, fígado e rim, 24h após a injeção intravenosa de 1mg/kg das soluções. O primeiro gráfico foi construído com todos os órgãos, onde se observa maior concentração de Au no fígado (Figura 23). Para um melhor entendimento da dinâmica específica de cada órgão, o gráfico foi desmembrado em 3 novos gráficos. No primeiro, quando observado o fígado separadamente, foi possível observar que houve uma grande concentração de ouro nos animais injetados com os nanomateriais comparado com o grupo salina, demonstrando que houve chegada e acúmulo no órgão [$F(2,9) = 200,5$; $p < 0,0001$] (Figura 24). Analisando-se o rim, foi observado somente o acúmulo do nanocomplexo, não sendo observada a chegada do grupo AuNP [$F(2,9) = 17,69$; $p = 0,0005$] (Figura 25). No último gráfico, a análise foi feita somente com o encéfalo, separando-se as estruturas de interesse (hipocampo, estriado, cerebelo e córtex) e

não foi observada diferença entre os grupos injetados com as nanopartículas em comparação com o grupo salina, o qual estava livre do nanomaterial (Figura 26).

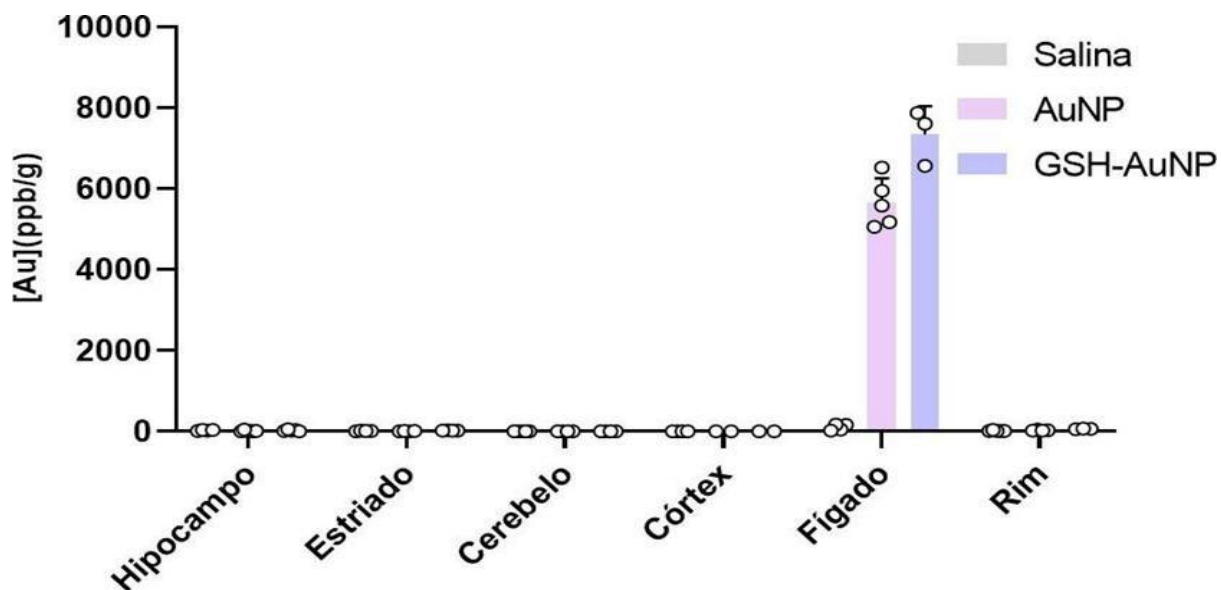


Figura 23: Análise da distribuição de ouro no cérebro, fígado e rim após 24h da injeção. O gráfico mostra a concentração de Au encontrada nos órgãos escolhidos, sendo o eixo y a concentração de Au em partes por bilhão por grama de órgão e o eixo x os órgãos e estruturas encefálicas escolhidas. Em cada estrutura foi avaliado um grupo controle (salina), um grupo AuNP e o nanocomplexo, sendo os dois últimos injetados na concentração de 1mg/kg (n=5-6, volume de injeção = 100 μ L). Pode-se observar que houve maior concentração de nanopartículas principalmente no fígado, seguido do rim. Não foi possível observar o nanomaterial no encéfalo. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão. Two-Way ANOVA, post hoc Tukey. n=4

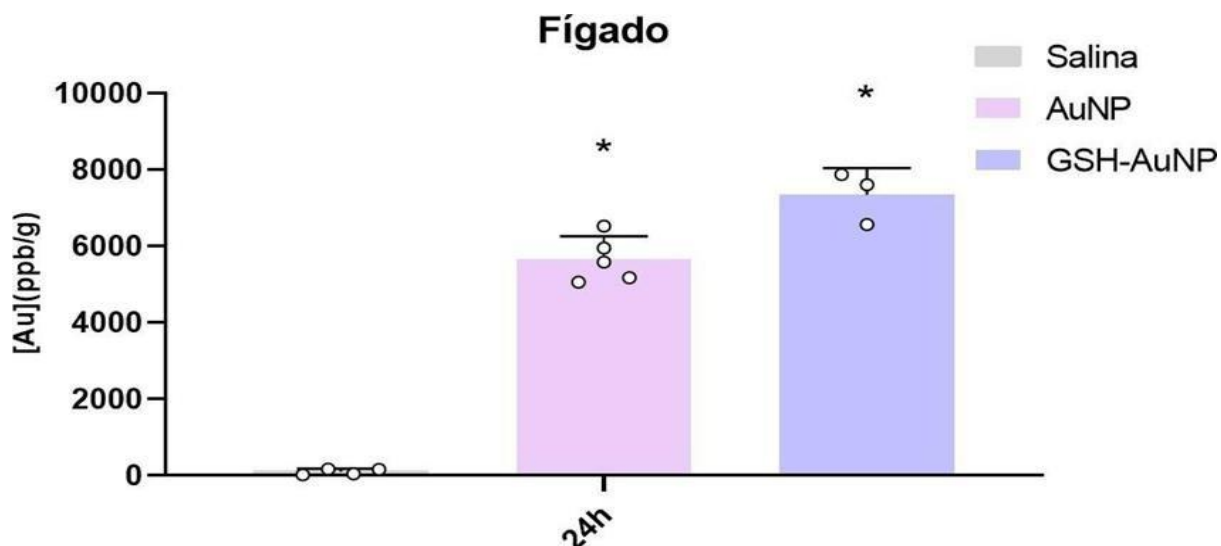


Figura 24: Análise da distribuição de ouro no fígado após 24h da injeção. O gráfico mostra a concentração de Au encontrada no fígado, sendo o eixo y a concentração de Au em partes por bilhão por grama de órgão e o eixo x o tempo da injeção intravenosa. A análise foi realizada comparando-se o grupo controle (salina) como grupo AuNP e o nanocomplexo, sendo os dois últimos injetados na concentração de 1mg/kg (n=5-6, volume de injeção = 100 μ L). Foi possível observar que tanto as AuNPs quanto o nanocomplexo foram capazes de chegar e concentrar-se no fígado [F (2,9) = 200,5; p<0,0001]. Os dados

são expressos como média $\pm$ desvio padrão. Ordinary one-Way ANOVA, post hoc Tukey. $n=3-5$

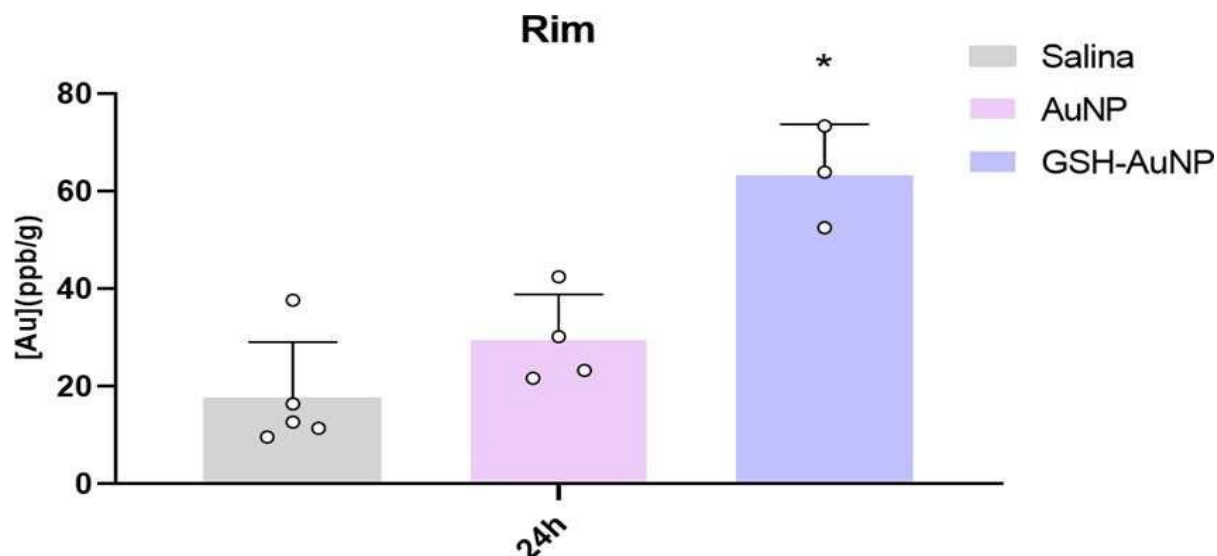


Figura 25: Análise da distribuição de ouro no rim após 24h da injeção. O gráfico mostra a concentração de Au encontrada no rim, sendo o eixo y a concentração de Au em partes por bilhão por grama de órgão e o eixo x o tempo da injeção intravenosa. A análise foi realizada comparando-se o grupo controle (salina) como grupo AuNP e o nanocomplexo, sendo os dois últimos injetados na concentração de 1mg/kg ($n=5-6$, volume de injeção = 100 μ L). Foi possível observar que somente o grupo do nanocomplexo foi capaz de chegar e concentrar-se no rim [$F(2,9) = 17.69$; $p=0,0005$]. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão. Ordinary one-Way ANOVA, post hoc Tukey. $n=3-5$

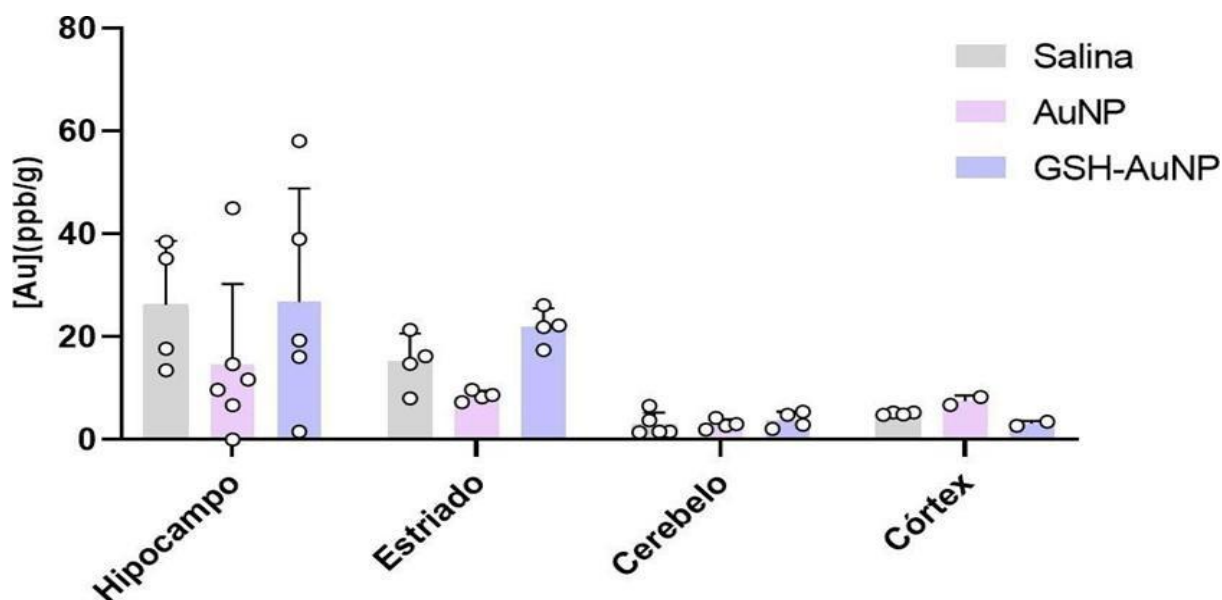


Figura 26: Análise da distribuição de ouro nas estruturas cerebrais após 24h da injeção. O gráfico mostra a concentração de Au encontrada em diversas estruturas do encéfalo, sendo o eixo y a concentração de Au em partes por bilhão por grama de órgão e o eixo x os órgãos e estruturas encefálicas escolhidas. Em cada estrutura foi avaliado um grupo controle (salina), um grupo AuNP e o nanocomplexo, sendo os dois últimos injetados na concentração de 1mg/kg ($n=5-6$, volume de injeção = 100 μ L). Não foi possível observar o nanomaterial em nenhuma das estruturas escolhidas. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão. Two-Way ANOVA, post hoc Tukey. $n=4$

**<Plenitude de conhecimento sempre significa alguma compreensão da
profundidade de nossa ignorância, e isso sempre conduz a tanto humildade
quanto reverência.=**

Robert A. Millikan

Prêmio Nobel de Física, 1923

5 DISCUSSÃO

5.1 Síntese e caracterização das nanopartículas

5.1.1 Síntese

As nanopartículas de ouro biofuncionalizadas com glutathione (GSH- AuNP) foram sintetizadas (Figura 12) a partir do protocolo de Chai e colaboradores, em que nanoesferas foram produzidas por meio do redutor NaBH_4 , biofuncionalizadas com glutathione (estabilizante) e utilizadas como detector de Pb^{2+} (CHAI et al., 2010b). Para a produção das AuNP controle, utilizamos o mesmo protocolo, só que com a ausência da GSH (Figura 13). Como já demonstrado na literatura, é possível sintetizar nanoesferas de ouro a partir de diversas substâncias redutoras que agem na nucleação, crescimento e multiplicação de esferas, e dependendo das escolhas do tipo de redutor, relação Au/redutor e ligantes, há a possibilidade da criação de uma imensa gama de nanomateriais, dependendo do seu objetivo de estudo.

Baseamos nosso trabalho no estudo de Chai e colaboradores (2010) em que desenvolveram uma rota de síntese utilizando o NaBH_4 como redutor e um peptídeo, a glutathione, como estabilizante para formação de nanoesferas de ouro com capacidade de detecção de chumbo. Neste estudo, as nanopartículas apresentaram monodispersão e tamanho em torno de 5-8 nm, demonstrando estabilidade e capacidade de sensoriamento (CHAI et al., 2010b). Pongsuchart (2012) e colaboradores utilizaram a mesma rota e, também observaram a formação de nanopartículas menores, em torno de 9 nm, e mais estáveis que as de citrato de sódio. Este estudo demonstrou que as espécies reativas de oxigênio geradas pela linha celular de fibroblastos 3T3 após exposição a várias concentrações de AuNPs revestidas com glutathione foram menores do que aquelas das células tratadas com AuNPs sem glutathione e com glutathione sozinha, demonstrando ação protetora (PONGSUCHART et al., 2012). Neste contexto a glutathione vem mostrando um papel importante, sendo um elemento chave na melhoria das rotas de síntese de nanopartículas de ouro.

Dividindo-se a concentração de redutor colocada na solução pela concentração de Au, foi observada uma razão molar (RM) de 2.5 (relação redutor/Au), um fator chave para uma melhor estabilidade. Dong e colaboradores (2020a) utilizaram dessa relação para sintetizar nanopartículas de 15 a 50 nm pelo

clássico método de Turkevich e discutiram que a vantagem deste método seria a possibilidade de controlar o tamanho das AuNPs mudando a razão molar (RM) entre citrato de sódio e HAuCl_4 . A chave para uma melhor estabilidade estaria na quantidade suficiente de redutor na solução ($\text{RM} > 3$) (DONG et al., 2020a). De acordo com Polte e colaboradores (2015, 2010) um grande número de partículas-semente (~ 2 nm de raio) foi formado à medida que a supersaturação dos átomos de ouro aumentava rapidamente (POLTE, 2015; POLTE et al., 2010). Se houvesse citrato suficiente na solução ($\text{MR} > 3$), as partículas seriam aproximadamente estabilizadas e o processo de crescimento das AuNPs e o tamanho final das partículas seriam aproximadamente os mesmos, independentemente do excesso molar (WUITHSCHICK et al., 2015). À medida que o MR diminui ($\text{MR} < 3$), teria menos citrato disponível para estabilizar as partículas-sementes. Consequentemente, ocorreria a agregação das partículas-semente, resultando em menos partículas, tamanhos finais de partículas maiores e forma menos esférica. Este raciocínio também pode ser aplicado a outros redutores, como o NaBH_4 . No nosso trabalho foi escolhido utilizar somente o NaBH_4 , utilizando a rota bastante conhecida na literatura que usa de peptídeos para gerar maior estabilidade e capacidade de ligação de uma variedade de drogas e substâncias (CHAI et al., 2010b; PONGSUCHART et al., 2012), gerando um possível nanocarreador para doenças do sistema nervoso central, foco dos nossos estudos.

Outro fator que interfere na estabilidade de uma solução é a concentração inicial de HAuCl_4 que tem uma relação direta com o índice de polidispersão, que indica a homogeneidade de uma solução. Neste trabalho, a concentração inicial de HAuCl_4 foi de 0,8mM corroborando com estudos da literatura que observaram que a polidispersidade é reduzida quando a concentração inicial é baixa ($< 0,8\text{mM}$) (ZABETAKIS et al., 2012).

Decidimos também sintetizar as mesmas nanopartículas só que sem a presença da glutathione (que chamamos de AuNP) para criar um grupo controle que serviria para comparar suas ações com a modificação da bioconjugação da glutathione. Uma vez observado que fomos capazes de gerar soluções estabilizadas, decidimos caracterizá-las quanto a sua forma, carga, tamanho e rendimento para ter certeza de que sintetizamos as nanopartículas com as características desejadas.

5.1.2 Caracterização quanto a forma das nanopartículas

Um dos modos de analisar a forma da nanopartícula é a partir do pico do espectro de absorbância, análise por espalhamento de luz em contato com a superfície, em que é sabido pela literatura que amostras com somente um pico em torno de 520nm apresentam formato esférico (AMENDOLA et al., 2017). A partir da ressonância plasmônica de superfície, foi observado que as AuNP apresentaram λ_{max} de 530nm, enquanto as GSH-AuNP apresentaram 520nm, sendo seu formato esférico inferido e mostrando o deslocamento do pico máximo de absorbância, demonstrando modificação da superfície, sendo um indicador da ligação da GSH (Figura 9). Nanoesferas de ouro apresentam diversas vantagens de uso quando comparadas com nanopartículas de outros formatos, como, por exemplo, sua excelente biocompatibilidade, baixa toxicidade, facilitação de passagem pela barreira hematoencefálica e síntese simples (ELAHI; KAMALI; BAGHERSAD, 2018; NEJATI et al., 2022). Além de serem utilizadas para diversas aplicações biomédicas, como sensoriamento, imageamento, diagnóstico, terapias e sistemas de transporte para entrega de drogas (GARCIA-ETXARRI; YUSTE, 2021; SARFRAZ; KHAN, 2021). Todas essas propriedades resultam em um nanomaterial extremamente versátil e com características promissoras para nosso objeto de estudo, o uso como carreador e neuroprotetor para o AVE isquêmico.

5.1.3 Caracterização quanto a carga das nanopartículas

O potencial Zeta, que indica a carga superficial detectada, foi analisado, e as AuNP apresentaram carga de -31,4mV, enquanto a GSH- AuNP foi de -27mV (Figura 10), sendo essa mudança também um indicativo de funcionalização (CHAI et al., 2010b). Como demonstrado na literatura, nanopartículas com potencial Zeta em torno de -30mV ou +30mV apresentam grande estabilidade, uma vez que é gerada uma forte repulsão elétrica entre as partículas em suspensão, sendo menos propensas a se agregarem ou aglomerarem (PONGSUCHART et al., 2012).

É sabido pela literatura que nanopartículas carregadas negativamente tem maior dificuldade de absorção celular. Este fato pode ser contornado pela biofuncionalização, modificando a superfície da esfera com ligantes que aumentem a estabilidade e biocompatibilidade, no nosso caso com o uso da glutathione (SIBUYI et al., 2021; ZHANG; MOU; JIANG, 2020). Estudos já demonstraram que ao alterar a química de superfície das AuNPs com moléculas de revestimento, aumentam fortemente a radioterapia do câncer, como no caso de AuNPs ultrapequenas

metabolizáveis (tamanho do núcleo $\sim 1,5$ nm) com um ligante de revestimento biocompatível (glutathiona, GSH). As GSH-AuNPs podem se acumular preferencialmente em tumores por meio do efeito de permeabilidade e retenção aprimoradas (EPR) melhorado. Após o tratamento, as GSH-AuNPs podem ser eficientemente eliminadas pelos rins, o que minimiza quaisquer potenciais efeitos colaterais (ZHANG et al., 2014b). No estudo de Pongsuchart e colaboradores (2012), as GSH-AuNPs negativamente carregadas foram capazes de diminuir o estresse oxidativo gerado por fibroblastos 3T3 (PONGSUCHART et al., 2012), assim como Jabir e colaboradores (2020) também observaram aumento da ação scavenging das GSH-AuNPs negativamente carregadas em modelos de indução de apoptose em células SKOV-3 (JABIR et al., 2020).

Com isso, obtivemos mais indicativos da produção de uma solução estável, com menor propensão de agregação e facilitação de absorção celular, podendo agir em terapias de diversas doenças.

5.1.4 Caracterização quanto o tamanho das nanopartículas

Corroborando com a análise de espectrofotometria, por meio da análise de microscopia eletrônica de transmissão, foi comprovado seu formato esférico (Figura 11). Analisando as imagens de microscopia, por meio do programa Image J, também foi possível gerar histogramas de distribuição de tamanhos, onde foi observado que tanto as AuNP (Figura 11A, B) quanto as GSH-AuNP (Figura 11C, D) apresentaram uma média de tamanho de 6nm, corroborando com os achados de Chai e colaboradores (2010), em que sintetizaram nanopartículas conjugadas com GSH entre 5 e 8 nm (CHAI et al., 2010b).

Há diversas vantagens do uso de nanopartículas deste tamanho, uma vez que apresentam facilitação de passagem por barreiras e células do organismo, além de apresentar distribuição de tamanho estreita por causa de sua síntese mais precisa e monodispersa, o que facilita sua ação terapêutica (ARVIZO; BHATTACHARYA; MUKHERJEE, 2010), o que pode ser observado nos gráficos de distribuição de tamanho (Figura 17B, D), mostrando principalmente que a conjugação de glutathiona melhora a monodispersão quando comparada com as AuNPs. Essas nanopartículas permitem conjugações personalizadas com anticorpos ou outras moléculas, como a glutathiona, proporcionando versatilidade nas

funcionalizações; isso juntando-se o fato de sua maior relação superfície de contato/volume para ligação de moléculas quando comparado com partículas maiores, o que resulta numa maior quantidade de drogas e fármacos chegando no órgão de interesse (MILAN; NIEMCZYK; KUS- LIŚKIEWICZ, 2022). Por apresentarem tamanho reduzido e no caso do nosso estudo, sendo realizada a biofuncionalização com GSH, a agregação e a ligação não específica são reduzidas e apresentam a capacidade de serem concentradas mais de 5.000 vezes, aumentando assim sua estabilidade e utilidade (SOUSA et al., 2016b; VINLUAN et al., 2014).

Outro fator importante da síntese de nanopartículas de 6 nm é o fato de nanopartículas ultrapequenas ($< 2\text{nm}$) e grandes ($\geq 50\text{nm}$) apresentarem danos a células do organismo. A primeira, pela sua capacidade de adentrar o núcleo celular e destruir o DNA e a segunda pelo seu grande tamanho aumentar a probabilidade de aglomeração ou agregação (ALKILANY; MURPHY, 2010). Considerando todas essas vantagens na utilização de nanopartículas de 6 nm e obtendo sucesso na sua síntese, decidimos então estudar o rendimento da síntese em relação à ligação da glutathione às AuNPs.

5.1.5 Caracterização quanto a taxa de ligação da glutathione

Também foi determinada a taxa de ligação de GSH às nanopartículas e sua concentração na solução final. Foi escolhido um ensaio que pudesse analisar a GSH livre e encontramos o Folin Ciocalteu, que avalia substâncias redutoras, que se encaixa perfeitamente com a GSH (BERKER et al., 2013). Por meio desta análise, foi obtida uma taxa de 92,5% que corresponde a 1,38mg/mL de GSH na solução final após centrifugação (Tabela 5). Esta taxa de ligação demonstra que uma grande parte da GSH se ligou nas AuNPs e uma possível explicação é que a GSH é colocada no começo da reação antes do redutor, aumentando suas chances de ligação. A glutathione possui um grupo sulfidril (-SH) altamente polarizável, que a torna um bom nucleófilo para reações com compostos eletrofílicos. Esta habilidade de doar elétrons a outros compostos faz da glutathione um excelente agente redutor, portanto, é possível que ela tenha feito parte da redução e formação das esferas (LIM et al., 2008; ZHOU et al., 2010).

Ao mesmo tempo, foi determinada a quantidade de moléculas de GSH que se ligam a cada nanopartícula. Para isso, fizemos um cálculo levando em consideração

diversos parâmetros relacionados à forma, densidade e volume das nanoesferas, assim como massa molar e densidade do ouro e dos outros elementos que compõem as soluções (Figura 18). Por meio do cálculo, foi possível encontrar 190 moléculas de GSH por nanoesfera de ouro. A vantagem do rendimento da síntese proporcionar tantas moléculas ligadas a cada nanoesfera é a capacidade do nanocomplexo atuar como nanocarreador, aumentando a quantidade de droga que chega a determinado órgão ou célula quando comparado com a droga livre, gerando tratamentos mais eficazes e com menos efeitos colaterais, uma vez que haveria a necessidade da administração de menos doses para atingir o mesmo efeito terapêutico (BRUCH et al., 2019; DARAEE et al., 2016; HUANG et al., 2023; SIBUYI et al., 2021). Já é sabido que o uso das nanopartículas gera essa vantagem por ela apresentar maior relação superfície de contato/volume para ligação de moléculas quando comparado com partículas maiores.

Além disso, dependendo do fármaco administrado, ele é rapidamente degradado ao longo de sua passagem pelo organismo, e o uso da nanopartícula diminui sua detecção pelo sistema imunológico, consequentemente melhorando a eficácia do tratamento (AMINA; GUO, 2020; CHANDRAKALA; ARUNA; ANGAJALA, 2022). Jabir e colaboradores (2020) compararam a ação scaveging de nanopartículas biofuncionalizadas com glutathione e ligadas ao linalol às nanopartículas controle e ao linalol livre em células SKOV-3 e observaram que o nanocomplexo apresentava melhor ação quando comparado aos outros grupos, demonstrando a eficácia de um nanocarreador em uma região específica gerando melhores resultados que a droga livre (JABIR et al., 2020).

Isso demonstra o sucesso da síntese, uma vez que conseguimos gerar um rendimento alto de ligação de moléculas de GSH, sendo um indicador da formação de uma nanoplataforma carreadora. Assim sendo, nossa próxima pergunta foi determinar a concentração de ouro e nanopartículas presentes nas soluções para seu uso nos modelos de isquemia *in vitro*.

5.1.6 Caracterização quanto a concentração de ouro

Por último, a partir da densidade óptica determinada na espectroscopia de absorvância e do raio das nanopartículas (Tabela 1), também foi analisada a concentração de ouro em ambas as soluções. Foi observado 82mg/L de AuNPs na solução controle (Tabela 1A) e 44mg/L no nanocomplexo (Tabela 1B), esta

diminuição justificada pela necessidade de centrifugar a última para que a GSH livre fosse retirada. Comparando com o artigo escolhido como referência, o rendimento da nossa solução foi maior, gerando 0,2 mM de ouro, enquanto a síntese de Chai e colaboradores (2010) foi de 0,2 nM (CHAI et al., 2010b), conseguindo assim um rendimento que possibilitaria condições de trabalho na faixa de concentração terapêutica desejada. Como nosso objetivo era gerar diluições na concentração máxima de 800 µg/L, nosso rendimento foi mais do que suficiente para fazer as diluições. A partir dos dados da concentração de ouro, pudemos gerar novas concentrações para serem analisadas no modelo de privação de oxigênio e glicose.

5.2 Tratamento da isquemia cerebral

A discussão do tratamento da isquemia cerebral será dividida em dois períodos: isquemia e reperfusão. No primeiro serão discutidas as análises de LDH e glutamato, vias deletérias que ocorrem majoritariamente nos primeiros momentos após a diminuição ou cessação do fluxo sanguíneo. No segundo serão analisadas as caspases, uma das últimas vias do processo isquêmico.

5.2.1 Período isquemia

5.2.1.1 Análise do dano celular

A primeira análise realizada para observar os efeitos de tratamento dos grupos escolhidos foi o dano celular causado pelo modelo de privação de oxigênio e glicose. Foram avaliados dois grupos além do nanocomplexo como controles para melhor entendimento e observação de suas ações individuais, sendo eles a GSH e a AuNP. Por meio da análise do LDH é possível avaliar o dano causado pelo protocolo, uma vez que sua liberação ocorre quando a membrana celular é danificada e essa enzima é eliminada no meio (BUNDGAARD et al., 2019; MARKERT, 1984b), ocorrendo principalmente nos primeiros momentos após a instalação da isquemia. Esta análise é um teste indireto, uma vez que a função do LDH na reação enzimática realizada é de catalizador e avalia rompimento de membrana celular. Os grupos que passaram pela privação foram chamados de OGD e os que não passaram, nOGD. Como mostrado na Figura 18, foi observada maior liberação de LDH no grupo OGD controle quando comparado com nOGD controle. Isso mostra que o modelo gera os danos celulares esperados como já foi demonstrado na

literatura (BUNDGAARD et al., 2019). Wang e colaboradores (2021) e Jin e colaboradores (2022) observaram pacientes de diversas regiões da China e compararam os níveis de LDH e sua relação com mortes por isquemia. Foi constatado que os pacientes que apresentavam maiores taxas de LDH, tinham maior risco de morte (JIN et al., 2022; WANG et al., 2021).

Uma vez observado que o protocolo foi um sucesso, foram analisados os grupos tratamento. A concentração de GSH foi escolhida a partir do trabalho de Gromnicova e colaboradores (GROMNICOVA et al., 2013), em que foi observada uma maior viabilidade em células hCMEC/D3 quando tratados com 32 µg/mL de GSH. A concentração de 100 µg/mL foi determinada com o pressuposto de uma possível maior viabilidade no modelo isquêmico. Entretanto, não foi observada proteção pela GSH na isquemia, diferentemente do observado nos trabalhos de Yabuki et al (2013) e Wang et al (2022), em que em ratos foram submetidos a BCAAo e a GSH administrada por gavagem, nas concentrações de 100 mg/kg e 500 mg/kg aumentando a concentração de GSH no hipocampo, com consequente aumento das defesas antioxidantes, a viabilidade celular e diminuição de citocinas pró-apoptóticas, assim como melhora do escore neurológico e o volume de infarto (WANG et al., 2022; YABUKI; FUKUNAGA, 2013). Uma vez observado que esta concentração não foi neuroprotetora, hipotetizamos que seja necessário fazer uma curva de concentração x resposta da GSH para encontrar uma concentração protetora neste modelo, uma vez que somente uma concentração não possibilita uma descrição mais completa das ações do peptídeo.

Com o intuito de determinar a melhor concentração de GSH-AuNP com melhor efeito, decidimos gerar uma curva concentração x resposta, englobando as concentrações de 0,08 µg/L, 0,8 µg/L, 8 µg/L, 80 µg/L e 800 µg/L. Estas concentrações foram escolhidas a partir do trabalho de Zheng e colaboradores (2019), em que não foi observada toxicidade das AuNPs na concentração de 800 µg/L em cultura de neurônios corticais (ZHENG et al., 2019a). Este trabalho foi escolhido como referência porque até o momento, não existem estudos que avaliam o uso de GSH-AuNPs em modelos de isquemia e queríamos uma faixa de concentrações não tóxicas a células neuronais. Corroborando com dados do artigo citado, não houve toxicidade em nenhum dos grupos tratamento, o que podemos ver comparando-se os grupos nOGD tratamento com nOGD controle no gráfico, em que a concentração de LDH liberado no meio não apresentou diferença estatística.

Assim como neste dado, Gromnicova e colaboradores (2013) também observaram que GSH-AuNPs de 4 nm não apresentavam toxicidade em células hCMEC/D3 (GROMNICOVA et al., 2013).

Observando os grupos OGD GSH-AuNP, foi possível observar que somente o grupo 0,8 µg/L apresentou neuroproteção, uma vez que houve menor liberação de LDH quando comparado com o grupo OGD controle [$F(5, 109) = 41,00$; $p < 0,0001$]. Como o objetivo do trabalho era desenvolver uma plataforma carreadora com vantagens acima das AuNPs não biofuncionalizadas, decidimos usar as concentrações das pontas da curva para análise das AuNPs (800 µg/L e 0,08 µg/L) e observar suas ações frente à liberação de LDH no modelo. Como observado no gráfico da Figura 18, nenhuma das duas concentrações foi capaz de proteger as fatias da isquemia, uma vez que não houve diferença estatística quando comparado com o grupo OGD controle. Na literatura, a maioria das AuNPs que foram capazes de proteger as fatias cerebrais do dano isquêmico apresentavam tamanho de 20 nm, sendo sintetizadas com citrato de sódio e não biofuncionalizadas (EL-SAYED; YOUSSEF; SHALABY, 2017; ZHENG et al., 2019a), o que abre uma oportunidade de estudo para novos tamanhos de nanopartículas, redutores e suas modificações. Liu e colaboradores (2013) observaram que AuNPs de 5 nm sintetizadas com NaBH₄ apresentavam ações contrárias à de neuroproteção quando comparadas com as de 20 nm, corroborando com nossos dados (LIU et al., 2013b). Observando-se que a GSH-AuNP na concentração de 0,8 µg/L gerou neuroproteção, surge a vantagem de usar a GSH na biofuncionalização, demonstrando que é possível gerar nanopartículas menores com ações neuroprotetoras.

5.2.1.2 Análise da liberação de glutamato

Uma vez analisado o dano celular e observado o uso promissor do nanocomplexo no modelo isquêmico, foi decidido estudar uma das primeiras vias deletérias da isquemia, a liberação de glutamato. Do mesmo modo como ocorre em seres humanos, quando há a diminuição do fluxo sanguíneo, há influxo de íons Ca²⁺, com consequente liberação em grande quantidade do neurotransmissor excitatório glutamato na fenda sináptica, não sendo recaptado facilmente, se tornando um dos primeiros processos de dano isquêmico. Ele é um dos sinalizadores dos processos futuros de dano e morte celular (DÁVALOS et al., 1997; DEB; SHARMA; HASSAN, 2010; DESSI et al., 1993).

Como demonstrado nos resultados, foi observada uma maior liberação de glutamato no grupo OGD controle quando comparado com o grupo nOGD controle. Este dado sustenta a relação do neurotransmissor com o processo isquêmico, sendo seu aumento indicador de dano isquêmico (BENVENISTE et al., 1984; FERRIGNO et al., 2018; XU et al., 2017). Não foi observada toxicidade glutamatérgica, o que pode ser notado comparando os grupos nOGD tratamento com o grupo nOGD controle. Este achado pode ser explicado pelo fato de que em um ambiente de homeostasia, e sendo os tratamentos os únicos modificadores, não houve diferença nesta sinalização.

Em relação aos grupos tratamento, não foi observada neuroproteção no grupo GSH, dado que pode ser observado comparando os grupos OGD controle e OGD GSH. Com o intuito de entender melhor esse resultado, uma busca na literatura foi realizada procurando por trabalhos que mostrassem a relação GSH/glutamato. Coughlin e colaboradores (2021) avaliaram pacientes com esquizofrenia que apresentaram uma correlação positiva entre GSH e glutamato, demonstrando que uma vez que há aumento das defesas antioxidantes, há concomitantemente, o aumento da sinalização glutamatérgica, o que poderia explicar o aumento de glutamato no gráfico. Porém, eles apontam que são necessários mais estudos para entender melhor esta dinâmica (COUGHLIN et al., 2021), e assim como levantado na discussão da análise de LDH, uma curva concentração x resposta também deve ser feita para melhor compreensão desta relação.

Em relação ao GSH-AuNP, as mesmas concentrações escolhidas para a curva para análise de LDH também foram analisadas neste ensaio. Também foram observadas ações protetoras, como na análise do dano celular, porém com outra concentração. Dentre as concentrações da curva de concentração x resposta da GSH- AuNP, foi observada proteção na concentração de 0,08 µg/L, fato observado comparando-se o grupo OGD controle com o OGD GSH-AuNP. Assim como observado na análise de LDH, quando analisados os efeitos das duas concentrações de AuNP, não foi observada neuroproteção, levantando a mesma discussão do tópico anterior em relação às vantagens do uso da GSH. Além disso, na literatura, o que mais é observado são tratamentos com AuNPs em modelos de isquemia *in vivo*, como o MCAo, utilizando nanopartículas ultrapequenas e grandes e comparando suas ações nas vias isquêmicas. As nanopartículas de 20nm demonstraram os melhores resultados, diminuindo estresse oxidativo, citocinas pró-

inflamatórias, assim como o escore neurológico e o volume de infarto, ao mesmo tempo que aumentavam a viabilidade celular, enquanto houve reversão desta proteção com as de 2 nm, 5 nm e 50 nm (EL- SAYED; YOUSSEF; SHALABY, 2017; LIU et al., 2013b; ZHENG et al., 2019a). A adição de GSH na produção das nanopartículas gerou grande vantagem neste modelo, tornando promissor seu uso na isquemia. Uma possível explicação para esta realidade, é que a GSH torna a solução mais monodispersa, evitando aglomerações e agregações, além de apresentar maior biocompatibilidade com as fatias, permitindo uma melhor interação com o ambiente biológico (HARPER et al., 2014; PEM et al., 2019; WU et al., 2014).

Essa funcionalização também torna a plataforma um promissor carreador, facilitando a ligação de drogas, fármacos e substâncias (JABIR et al., 2020; PEM et al., 2019; WU et al., 2014), aumentando assim a biodisponibilidade e a entrega órgão- específico – estratégia que pretendemos estudar futuramente, uma vez que a ligação direta com o ouro necessita de um grupo -S. Há também diferenças quanto a nanopartículas sintetizadas com outros redutores, como o citrato de sódio e o ácido cítrico gerando nanopartículas de tamanhos diferentes e sendo utilizada uma diversa gama de ligantes, gerando plataformas com propriedades ópticas e farmacológicas distintas. (SOUSA et al., 2012; VERGARA-CASTAÑEDA et al., 2019; VIJAYAKUMAR; GANESAN, 2012; ZHENG et al., 2019a).

Na literatura, outras nanopartículas também interagiram com a excitotoxicidade gerada pela grande liberação de glutamato. Lv e colaboradores (2018) desenvolveram um nanocarreador composto por um núcleo de polímero de dextrana modificado com éster borônico para carregamento de NR2B9C, um agente protetor regulador de EROs e observaram que o nanocomplexo teve grandes efeitos protetores contra a citotoxicidade induzida por glutamato em células PC-12 (LV et al., 2018). Na literatura, a maioria dos artigos desenvolvem AuNPs como biosensores para glutamato, ou biofuncionalizam as AuNPs com ele, não avaliando exatamente sua relação com a excitotoxicidade glutamatérgica no processo isquêmico (PEI et al., 2022; SHARMA et al., 2022; ZEYNALOO et al., 2021), fazendo com que os dados gerados por nosso trabalho abram maiores possibilidades de estudos de neuroproteção.

A partir dos dados gerados no período da isquemia, foi demonstrado que as nanopartículas de 6 nm funcionalizadas com GSH são capazes de gerar neuroproteção nos primeiros momentos pós insulto, o que demonstra uma grande

novidade. Além disso, esses dados apontam uma importante discussão em relação às primeiras vias de sinalização da isquemia e de que como é significativa a concentração de glutamato presente no meio, que, conseqüentemente, não foi recaptado da fenda sináptica pelos astrócitos. Este glutamato remanescente pode ser capaz de continuar a sinalização de Ca^{2+} que, por conseguinte, ativa as próximas cascatas deletérias da isquemia (ALI et al., 2019). Por isso, mais investigações são necessárias para obter uma compreensão mais profunda da interação entre nanopartículas de ouro e outras vias prejudiciais associadas à isquemia cerebral. Dentre as vias deletérias subsequentes da isquemia, foi escolhida a morte celular, presente no próximo período estudado: a reperfusão.

5.2.2 Período reperfusão

5.2.2.1 *Análise do dano celular*

Foi decidido também analisar a liberação de LDH no momento da reperfusão, que durou 2 horas de acordo com o protocolo escolhido. Porém, diferentemente do observado no período da isquemia, não foi observada maior liberação de LDH no grupo controle OGD quando comparado com o grupo nOGD, não sendo possível, conseqüentemente, avaliar a ação dos grupos tratamento.

Uma possível explicação para este resultado é que a maior liberação de LDH e conseqüente dano celular, ocorreu especificamente no momento da isquemia, não sendo possível detecção horas após o começo do insulto. Em contrapartida, dados obtidos por nosso grupo, já demonstraram que há aumento de LDH no período da reperfusão (GONÇALVES et al., 2022). Esta diferença nos dados pode ser explicada talvez pela mudança na espécie dos animais utilizados nos experimentos, sendo que no estudo anterior foram utilizados camundongos C57/Bl6 e neste, foram utilizados CD1.

5.2.2.2 *Análise da morte celular*

5.2.2.2.1 Atividade das caspases -3 e -9

Até o momento, todas as análises foram feitas no sobrenadante das amostras, sendo o ACSF com glicose o veículo utilizado. Para o estudo das caspases, foi utilizado o tecido hipocampal, que depois de macerado, foi

ressuspendido também em ACSF com glicose. Esta etapa serviu tanto para a análise de caspases tanto para a determinação das proteínas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976b).

Como as caspases são as vias de morte celular, elas devem ser analisadas preferencialmente no período da reperfusão (MOURÃO et al., 2014). Neste estudo, foi decidido utilizar o mesmo tempo de reperfusão da análise do LDH, sendo assim 2 horas. Esse tempo foi escolhido baseado no artigo publicado pelo nosso grupo de pesquisa, em que também foram utilizadas 2 horas de reperfusão em fatias hipocampusais de camundongos C57/Bl6 para análise de LDH e morte celular por marcação de tecido por etídio homodímero. Neste trabalho, foi observado que 2 horas é um período suficiente para se observar as ações de tratamento do peptídeo alamandina no modelo isquêmico (GONÇALVES et al., 2022). Com este mesmo pensamento, realizamos o ensaio das caspases no tecido cerebral, porém não observamos aumento da atividade nem de caspase-3 nem de caspase-9, como pode ser observado nos gráficos das Figuras 21 e 22.

Por esta razão, fizemos uma extensa busca na literatura para entender o porquê deste resultado e pudemos compreender que o tempo da reperfusão precisa ser aumentado, possibilitando que o processo de atividade de caspases seja devidamente desenvolvido (NAZARIAN et al., 2020; TUO; ZHANG; LEI, 2022). Mourão e colaboradores (2014) realizaram o mesmo protocolo, em que foram escolhidos 20 minutos de isquemia e 4 horas de reperfusão. Neste estudo feito em ratos Wistar foi possível observar o aumento da expressão das duas caspases na isquemia e proteção em animais que praticavam exercícios físicos (MOURÃO et al., 2014), demonstrando que um maior tempo de reperfusão oferece o ambiente necessário para os estudos. Em modelos de isquemia *in vivo*, também foram observados dados parecidos. Liu e colaboradores (2013) também observaram aumento da expressão de caspase-3 em ratos machos Sprague-Dawley submetidos à cirurgia de MCAo. Eles foram isquemiados por 90 minutos e o tempo mínimo de reperfusão analisado foi de 6 horas (LIU et al., 2013b). Corroborando com estes dados, El-Sayed e colaboradores (2017) observaram aumento da expressão da caspase-3, 24h após o insulto isquêmico em ratos Wistar (EL-SAYED; YOUSSEF; SHALABY, 2017).

Mesmo em alguns trabalhos que não estudaram o processo isquêmico, pode ser observado o aumento dessas caspases em modelos de toxicidade celular em

que o tempo de exposição das células aos modelos sempre era maior, de várias horas a dias (BAHARARA et al., 2016; BERNARDO-CASTRO et al., 2021; KE et al., 2019; LIU et al., 2016). Com este pensamento, infere-se que o tempo de reperfusão deveria ser aumentado para 4 horas e feita uma nova análise dos grupos tratamento.

5.3 Biodistribuição

Como última análise, decidimos avaliar a capacidade de biodistribuição da nanoplateforma no sistema biológico. Escolhemos avaliar 24h após a injeção dos grupos tratamento, uma vez que grande parte dos estudos na literatura observou uma grande dispersão das AuNPs pelo organismo neste período, sendo o fígado e o rim os órgãos mais avaliados (HIRN et al., 2011; IRVIN-CHOY et al., 2021; KOZICS et al., 2021; SIMPSON et al., 2013).

Foi escolhido o ICP-MS como ferramenta de análise para determinação e quantificação de ouro nas amostras. Diversas ferramentas podem ser usadas para este ensaio como microscopia confocal, a espectrometria gama, o TEM e a espectrometria de absorção atômica (DAEMS et al., 2020; LAURENT et al., 2021). Esta escolha foi feita baseada no estudo de Sonavane e colaboradores (2008) em que AuNPs de diversos tamanhos foram analisadas por ICP-MS após 24h de injeção intravenosa e foi observado acúmulo em diversos órgãos, incluindo o cérebro (SONAVANE; TOMODA; MAKINO, 2008a).

Como pode ser observado nos gráficos, três grupos foram estudados. O primeiro chamado de salina em que os animais foram injetados intravenosamente com o veículo, a solução salina NaCl 0,9%, sendo assim o grupo controle do experimento. O segundo grupo foi formado pelas AuNPs não biofuncionalizadas, sendo o controle dos grupos tratamento. E o terceiro, em que foram injetadas as GSH-AuNPs com o intuito de observar sua dispersão e a influência da adição da GSH no nanocomplexo. Se bem observado, os grupos controle com salina mesmo não contendo o nanomaterial apresentaram valores positivos e altos em todos os gráficos. Isso pode ser explicado por uma possível contaminação nos tubos do equipamento por onde as amostras passam. Por isso, estes valores devem ser considerados os basais e subtraídos dos grupos tratamento.

Para esta análise, foram escolhidos além do fígado e do rim, algumas estruturas cerebrais, uma vez que um dos objetivos do trabalho foi desenvolver uma

nanoplataforma com capacidade de carrear drogas e fármacos para o SNC. Por isso, a passagem pela BHE e consequente chegada no cérebro são cruciais (CORREIA et al., 2022; FARKOUH et al., 2020).

De acordo com os resultados obtidos pelo ICP-MS, pode-se observar que a maior parte das nanopartículas se acumulou no fígado, um órgão extremamente importante na metabolização de drogas e fármacos (FARKOUH et al., 2020). Estes dados corroboram com outros estudos da literatura, em que além de grande acúmulo, o aumento de AuNPs foi dose dependente (ALJOHANI et al., 2022; HIRN et al., 2011). Simpson e colaboradores (2013) também observaram acúmulo de GSH- AuNPs de 1.2 nm, em uma concentração 60x maior que a utilizada neste trabalho, no fígado quando injetadas subcutaneamente em camundongos Balb/c. Foi observado também que não houve diferença entre os grupos tratamento, sendo que ambos se acumularam na mesma proporção no fígado. Na literatura, ainda não foi estudada a biodistribuição de GSH- AuNPs de 6 nm, sendo possível somente fazer comparações com nanopartículas de outros tamanhos, o que se sabe ser de grande importância, uma vez que as propriedades físico-químicas mudam de acordo com essas mudanças (SODIPO; MOHAMMED, 2024).

A injeção intravenosa é a via sistêmica mais comum para entrega de nanopartículas no corpo devido à sua alta biodisponibilidade. Depois que as nanopartículas são introduzidas na corrente sanguínea, suas interações com os componentes do sangue e sua capacidade de superar a barreira endotelial estão relacionadas ao tamanho e desempenham papéis cruciais na determinação de seu direcionamento e depuração (LI et al., 2020b; XU et al., 2023b). Pode-se observar também que mesmo a injeção intravenosa sendo uma das vias que melhor biodistribui as AuNPs, não sendo necessária sua passagem pelos sistemas de metabolização, a utilização de outras vias como a subcutânea e a intraperitoneal também fornecem grande dispersão das AuNPs pelo organismo, uma vez que elas conseguem chegar em outros órgãos como o baço, o coração e o pulmão (KOZICS et al., 2021; OZCICEK et al., 2021; SIMPSON et al., 2013).

Outro órgão que decidimos avaliar o acúmulo das AuNPs foi o rim, uma vez que ele é responsável pela filtração e clearance de drogas e fármacos. Além disso, as nanopartículas sintetizadas neste estudo têm caráter hidrofílico, portanto espera-se que grande parte se acumule neste órgão. Geralmente, as nanopartículas menores que 6 nm são mais facilmente filtradas pelos rins e eliminadas na urina,

enquanto as nanopartículas maiores que 6 nm tendem a ser sequestradas pelo fígado com retenção a longo prazo ou sofrer depuração hepatobiliar gradual (XU et al., 2023b). Além dessa via de depuração dependente do tamanho, as estruturas semelhantes a filtros do fígado e dos rins também controlam o transporte intraórgão de nanopartículas de maneiras dependentes, como filtração glomerular dependente do tamanho (DU et al., 2017), interação dependente do tamanho com células de Kupffer (TSOI et al., 2016), e biotransformação dependente do tamanho.

Variavelmente do observado no fígado, houve diferença entre os grupos AuNP e GSH-AuNP. Como pode ser observado no gráfico, houve o acúmulo do nanocomplexo no rim enquanto o mesmo não pode ser observado no grupo das AuNPs. Este resultado foi bastante interessante, principalmente por ser um indicador que a biofuncionalização com GSH melhora a captação da nanopartícula pelo rim. Uma possível explicação para este fenômeno é que o peptídeo gera nanoplateformas mais estáveis, melhorando sua biocompatibilidade com redução da genotoxicidade, como discutido anteriormente na introdução (HARPER et al., 2014; PEM et al., 2019). Assim como no fígado, o trabalho de Simpson e colaboradores (2013) também observou a presença de GSH-AuNPs no rim, sendo a concentração de ouro encontrada ainda maior que no fígado após 24h (SIMPSON et al., 2013). Este resultado abre portas para mais estudos de grupos que se interessam por avaliar a relação GSH-AuNPs com o sistema renal, podendo serem descobertos novos tratamentos e interações para doenças renais, gerando assim um nanomaterial nefroprotetor e um promissor nanocarreador para fármacos.

Uma vez analisado o acúmulo dos grupos tratamento nos órgãos mais estudados na literatura, fomos analisar a concentração de ouro encontrada nas estruturas cerebrais escolhidas. Neste ensaio, foram escolhidos o hipocampo, por ser a estrutura estudada no modelo isquêmico; e o estriado, o cerebelo e o córtex, por serem estruturas que normalmente são mais vulneráveis a processos isquêmicos sendo mais susceptíveis a danos por serem áreas de maior demanda de suprimento energético, elevada taxa de consumo de O₂, alto teor de ácidos graxos poli-insaturados e baixa concentração de defesas antioxidantes (KINDY; BHAT; BHAT, 1992; KORKMAZ et al., 2008; WU et al., 2012). Diferentemente do esperado, não pudemos observar ouro presente em nenhuma das estruturas, independente do grupo tratamento avaliado. Tanto as AuNPs quanto o

nanocomplexo não foram capazes de atravessar a BHE e chegar ao cérebro 24h após a injeção intravenosa dos nanomateriais.

Por isso, decidimos fazer uma busca na literatura para tentar entender o resultado obtido. Baseado nos estudos encontrados, nós hipotetizamos que o tempo de análise deve ser mudado, e, que na verdade, um melhor estudo dos tempos deve ser avaliado. Neste trabalho, só foi analisada a biodistribuição 24h após a injeção. Sendo assim, a análise realizada neste estudo foi pontual, tendo como resultado somente um período. Por esta razão, um estudo cinético da biodistribuição dos grupos tratamento é essencial, melhorando ainda mais a compreensão das propriedades físico-químicas da nanoplateforma utilizada. Por isso, mais tempos devem ser incluídos em futuros experimentos, como, por exemplo, 6h, 12h e até mais longos, como 48h e alguns dias (ALJOHANI et al., 2022; KUMAR et al., 2023b; OZCICEK et al., 2021). Mesmo que outros trabalhos tenham encontrado AuNPs no cérebro neste período (HIRN et al., 2011; SONAVANE; TOMODA; MAKINO, 2008a), como dito anteriormente, a nanopartícula sintetizada neste estudo ainda não foi abrangentemente estudada e mais estudos devem ser realizados para melhor compreensão de sua dinâmica nos sistemas biológicos.

<O cérebro é um mundo composto por um número de continentes inexplorados e grandes extensões de território desconhecido.=

Eric Kandel

Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina, 2000

6 CONCLUSÃO

Os dados obtidos neste estudo indicaram sucesso na síntese e biofuncionalização das nanopartículas de ouro com glutathione, além de demonstrar que as concentrações de GSH-AuNP mais baixas da curva de concentração x resposta foram capazes de neuroproteger as fatias hipocâmpais da privação de oxigênio e glicose, com diminuição da liberação de LDH, gerando menos dano e redução da liberação de glutamato, gerando menor excitotoxicidade glutamatérgica. Estes resultados destacam o potencial do GSH-AuNP como agente protetor contra danos celulares e toxicidade no modelo de isquemia cerebral *in vitro*.

<A melhor maneira de ter uma boa ideia é ter muitas ideias.=

Linus Pauling

Prêmio Nobel de Química, 1954, e Prêmio Nobel da Paz, 1962

7 REFERÊNCIAS

- ABBOTT, N. J.; RÖNNBÄCK, L.; HANSSON, E. Astrocyte–endothelial interactions at the blood– brain barrier. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 7, n. 1, p. 41–53, jan. 2006.
- ACHAR, A.; MYERS, R.; GHOSH, C. Drug Delivery Challenges in Brain Disorders across the Blood–Brain Barrier: Novel Methods and Future Considerations for Improved Therapy. **Biomedicines**, v. 9, n. 12, p. 1834, dez. 2021.
- ACHARYA, R. et al. Single-Walled Carbon Nanotube-Based Optical Nano/Biosensors for Biomedical Applications: Role in Bioimaging, Disease Diagnosis, and Biomarkers Detection. **Advanced Materials Technologies**, p. 2400279, 2024.
- ACKERMANN, J. et al. Biosensing with Fluorescent Carbon Nanotubes. **Angewandte Chemie (International Ed. in English)**, v. 61, n. 18, p. e202112372, 25 abr. 2022.
- AGGARWAL, P. et al. Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Identifying and Assessing Biomaterial Nanotoxicity in Translational Research for Preclinical Drug Development. v. 61, n. 6, p. 428–437, 21 jun. 2009.
- AGRAWAL, M. et al. Recent advancements in the field of nanotechnology for the delivery of anti-Alzheimer drug in the brain region. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 15, n. 6, p. 589– 617, 3 jun. 2018.
- AHMADPOUR, N.; KANTROO, M.; STOBART, J. L. Extracellular Calcium Influx Pathways in Astrocyte Calcium Microdomain Physiology. **Biomolecules**, v. 11, n. 10, p. 1467, 6 out. 2021.
- AHMED, S. et al. Biosynthesis of gold nanoparticles: A green approach. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 161, p. 141–153, 1 ago. 2016.
- AKINTELU, S. A.; YAO, B.; FOLORUNSO, A. S. Bioremediation and pharmacological applications of gold nanoparticles synthesized from plant materials. **Heliyon**, v. 7, n. 3, p. e06591, mar. 2021.
- AKSHAYA, K. et al. Bioconjugated gold nanoparticles as an efficient colorimetric sensor for cancer diagnostics. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 30, p. 101699, 1 jun. 2020.
- ALBANESE, A.; TANG, P. S.; CHAN, W. C. W. The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 14, p. 1–16, 2012.
- ALHADIDI, Q.; BIN SAYEED, M. S.; SHAH, Z. A. The Interplay between Cofilin and Phospho-Cofilin: Its Role in Maintaining Blood Brain Barrier Integrity. **CNS & neurological disorders drug targets**, v. 16, n. 3, p. 279–290, 2017.
- ALI, S. A. et al. Pregabalin affords retinal neuroprotection in diabetic rats: Suppression of retinal glutamate, microglia cell expression and apoptotic cell death. **Experimental Eye Research**, v. 184, p. 78–90, jul. 2019.
- ALJOHANI, F. S. et al. In vivo bio-distribution and acute toxicity evaluation of greenly synthesized ultra-small gold nanoparticles with different biological activities. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 6269, 15 abr. 2022.

ALKILANY, A. M.; MURPHY, C. J. Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: what we have learned so far? **Journal of Nanoparticle Research**, v. 12, n. 7, p. 2313–2333, set. 2010.

AMENDOLA, V. et al. Surface plasmon resonance in gold nanoparticles: a review. **Journal of Physics: Condensed Matter**, v. 29, n. 20, p. 203002, abr. 2017.

AMINA, S. J.; GUO, B. A Review on the Synthesis and Functionalization of Gold Nanoparticles as a Drug Delivery Vehicle. **International Journal of Nanomedicine**, 7 dez. 2020.

ANKARCRONA, M. et al. Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. **Neuron**, v. 15, n. 4, p. 961–973, out. 1995.

AOYAMA, K. Glutathione in the Brain. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 9, p. 5010, jan. 2021.

ARVIZO, R.; BHATTACHARYA, R.; MUKHERJEE, P. Gold nanoparticles: Opportunities and Challenges in Nanomedicine. **Expert opinion on drug delivery**, v. 7, n. 6, p. 753–763, jun. 2010.

AVERILL-BATES, D. A. Chapter Five - The antioxidant glutathione. Em: LITWACK, G. (Ed.). **Vitamins and Hormones**. Antioxidants. [s.l.] Academic Press, 2023. v. 121p. 109–141.

AVRUTSKY, M. I.; TROY, C. M. Caspase-9: A Multimodal Therapeutic Target With Diverse Cellular Expression in Human Disease. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, 9 jul. 2021.

AZAD, T. D. et al. Therapeutic strategies to improve drug delivery across the blood-brain barrier. **Neurosurgical Focus**, v. 38, n. 3, p. E9, mar. 2015.

BAHARARA, J. et al. Induction of Apoptosis by Green Synthesized Gold Nanoparticles Through Activation of Caspase-3 and 9 in Human Cervical Cancer Cells. **Avicenna Journal of Medical Biotechnology**, v. 8, n. 2, p. 75–83, 2016.

BANIN, U. et al. Nanotechnology for catalysis and solar energy conversion. **Nanotechnology**, v. 32, n. 4, p. 042003, nov. 2020.

BANKS, W. A. From blood–brain barrier to blood–brain interface: new opportunities for CNS drug delivery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 15, n. 4, p. 275–292, abr. 2016.

BARANI, M. et al. Recent Advances in Nanotechnology-Based Diagnosis and Treatments of Human Osteosarcoma. **Biosensors**, v. 11, n. 2, p. 55, fev. 2021.

BARRES, B. A. The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. **Neuron**, v. 60, n. 3, p. 430–440, 6 nov. 2008.

BAYDA, S. et al. The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical– Physical Applications to Nanomedicine. **Molecules**, v. 25, n. 1, p. 112, 27 dez. 2019.

BENVENISTE, H. et al. Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. **Journal of Neurochemistry**, v. 43, n. 5, p. 1369–1374, nov. 1984.

BERKER, K. I. et al. Modified Folin-Ciocalteu antioxidant capacity assay for measuring lipophilic antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 20, p. 4783–4791, 22 maio 2013.

BERNARDO-CASTRO, S. et al. Therapeutic Nanoparticles for the Different Phases of Ischemic Stroke. **Life**, v. 11, n. 6, p. 482, jun. 2021.

BERRIDGE, M. V.; SCHNEIDER, R. T.; MCCONNELL, M. J. Mitochondrial Transfer from Astrocytes to Neurons following Ischemic Insult: Guilt by Association? **Cell Metabolism**, v. 24, n. 3, p. 376–378, 13 set. 2016.

BEYENE, A. G. et al. Imaging striatal dopamine release using a nongenetically encoded near infrared fluorescent catecholamine nanosensor. **Science Advances**, v. 5, n. 7, p. eaaw3108, jul. 2019.

BIGHAM, N. P.; WILSON, J. J. Metal Coordination Complexes as Therapeutic Agents for Ischemia-Reperfusion Injury. **Journal of the American Chemical Society**, v. 145, n. 17, p. 9389–9409, 3 maio 2023.

BINDHU, M. R.; UMADEVI, M. Silver and gold nanoparticles for sensor and antibacterial applications. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 128, p. 37–45, 15 jul. 2014.

BISKER, G.; STRANO, M. S. (Invited) Synthetic Protein Recognition Using Fluorescent Single-Walled Carbon Nanotubes. **ECS Meeting Abstracts**, v. MA2017-01, n. 8, p. 636, 15 abr. 2017.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976a.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 7 maio 1976b.

BRUCH, G. E. et al. Liposomes for drug delivery in stroke. **Brain Research Bulletin**, v. 152, p. 246–256, 1 out. 2019.

BUNDGAARD, A. et al. Metabolic adaptations during extreme anoxia in the turtle heart and their implications for ischemia-reperfusion injury. **Scientific Reports**, v. 9, p. 2850, 26 fev. 2019.

BURSCH, W.; OBERHAMMER, F.; SCHULTE-HERMANN, R. Cell death by apoptosis and its protective role against disease. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 13, n. 6, p. 245–251, jun. 1992.

CAI, Z. et al. Role of Blood-Brain Barrier in Alzheimer's Disease. **Journal of Alzheimer's disease: JAD**, v. 63, n. 4, p. 1223–1234, 2018.

CARLANDER, D.; SKENTELBERY, C. EU Regulations and Nanotechnology Innovation. Em: LEAD, J. R.; DOAK, S. H.; CLIFT, M. J. D. (Eds.). **Nanotoxicology in Humans and the Environment**. Molecular and Integrative Toxicology. Cham: Springer International Publishing, 2021. p. 229–248.

CASALS, J. B. et al. The Use of Animal Models for Stroke Research: A Review. **Comparative Medicine**, v. 61, n. 4, p. 305–313, ago. 2011.

CASTELLANOS, M. et al. Inflammation-mediated damage in progressing lacunar infarctions: a potential therapeutic target. **Stroke**, v. 33, n. 4, p. 982–987, abr. 2002.

CASTILLO, J. et al. A novel mechanism of neuroprotection: Blood glutamate grabber. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 36, n. 2, p. 292–301, fev. 2016.

CEDERVALL, T. et al. Understanding the nanoparticle–protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 7, p. 2050–2055, 13 fev. 2007.

CHAI, F. et al. L-cysteine functionalized gold nanoparticles for the colorimetric detection of Hg²⁺ induced by ultraviolet light. **Nanotechnology**, v. 21, n. 2, p. 025501, 15 jan. 2010a.

CHAI, F. et al. Colorimetric Detection of Pb²⁺ Using Glutathione Functionalized Gold Nanoparticles. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 2, n. 5, p. 1466–1470, 26 maio 2010b.

CHAMORRO, Á. et al. Neuroprotection in acute stroke: targeting excitotoxicity, oxidative and nitrosative stress, and inflammation. **The Lancet. Neurology**, v. 15, n. 8, p. 869–881, jul. 2016.

CHANDRAKALA, V.; ARUNA, V.; ANGAJALA, G. Review on metal nanoparticles as nanocarriers: current challenges and perspectives in drug delivery systems. **Emergent Materials**, v. 5, n. 6, p. 1593–1615, 1 dez. 2022.

CHEN, C. et al. Insights into the Authentic Active Ingredients and Action Sites of Oral Exogenous Glutathione in the Treatment of Ischemic Brain Injury Based on Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Studies. **Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals**, v. 48, n. 1, p. 52–62, jan. 2020.

CHEN, L.; GAO, X. The application of nanoparticles for neuroprotection in acute ischemic stroke. **Therapeutic Delivery**, v. 8, n. 10, p. 915–928, out. 2017.

CHETYRKINA, M. R.; FEDOROV, F. S.; NASIBULIN, A. G. In vitro toxicity of carbon nanotubes: a systematic review. **RSC Advances**, v. 12, n. 25, p. 16235–16256, 23 maio 2022.

COMMANDEUR, J. N.; STIJNTJES, G. J.; VERMEULEN, N. P. Enzymes and transport systems involved in the formation and disposition of glutathione S- conjugates. Role in bioactivation and detoxication mechanisms of xenobiotics. **Pharmacological Reviews**, v. 47, n. 2, p. 271–330, jun. 1995.

CORREIA, A. C. et al. Lipid nanoparticles strategies to modify pharmacokinetics of central nervous system targeting drugs: Crossing or circumventing the blood– brain barrier (BBB) to manage neurological disorders. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 189, p. 114485, 1 out. 2022.

COUGHLIN, J. M. et al. A multimodal approach to studying the relationship between peripheral glutathione, brain glutamate, and cognition in health and in schizophrenia. **Molecular Psychiatry**, v. 26, n. 7, p. 3502–3511, jul. 2021.

CREIGHTON, J. A.; EADON, D. G. Ultraviolet–visible absorption spectra of the colloidal metallic elements. **Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions**, v. 87, n. 24, p. 3881–3891, 1 jan. 1991.

DA SILVA, A. R. et al. Alamandine abrogates neutrophil degranulation in atherosclerotic mice. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 47, n. 2, p. 117–128, fev. 2017.

DAEMS, N. et al. In Vivo Pharmacokinetics, Biodistribution and Toxicity of Antibody-Conjugated Gold Nanoparticles in Healthy Mice. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 16, n. 6, p. 985–996, 1 jun. 2020.

DAL BOSCO, L. et al. PEGylated carbon nanotubes impair retrieval of contextual fear memory and alter oxidative stress parameters in the rat hippocampus. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 104135, 2015.

DANEMAN, R.; PRAT, A. The blood-brain barrier. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 7, n. 1, p. a020412, 5 jan. 2015.

DARAEI, H. et al. Application of gold nanoparticles in biomedical and drug delivery. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 44, n. 1, p. 410–422, 2016.

DATTA, A. et al. Cell Death Pathways in Ischemic Stroke and Targeted Pharmacotherapy. **Translational Stroke Research**, v. 11, n. 6, p. 1185–1202, 1 dez. 2020.

DÁVALOS, A. et al. Duration of glutamate release after acute ischemic stroke. **Stroke**, v. 28, n. 4, p. 708–710, abr. 1997.

DE JONG, W. H. et al. Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration. **Biomaterials**, v. 29, n. 12, p. 1912–1919, 1 abr. 2008.

DEB, P.; SHARMA, S.; HASSAN, K. M. Pathophysiologic mechanisms of acute ischemic stroke: An overview with emphasis on therapeutic significance beyond thrombolysis. **Pathophysiology: The Official Journal of the International Society for Pathophysiology**, v. 17, n. 3, p. 197–218, jun. 2010.

DESSI, F. et al. Glutamate-Induced Neuronal Death Is Not a Programmed Cell Death in Cerebellar Culture. **Journal of Neurochemistry**, v. 60, n. 5, p. 1953–1955, 1993.

DHEYAB, M. A. et al. Gold nanoparticles-based photothermal therapy for breast cancer. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 42, p. 103312, 1 jun. 2023.

DIKSHIT, P. K. et al. Green Synthesis of Metallic Nanoparticles: Applications and Limitations. **Catalysts**, v. 11, n. 8, p. 902, ago. 2021.

DIRNAGL, U.; IADECOLA, C.; MOSKOWITZ, M. A. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. **Trends in Neurosciences**, v. 22, n. 9, p. 391–397, set. 1999.

DONALDSON, K. et al. Carbon Nanotubes: A Review of Their Properties in Relation to Pulmonary Toxicology and Workplace Safety. **Toxicological Sciences**, v. 92, n. 1, p. 5–22, 1 jul. 2006.

DONG, J. et al. Synthesis of Precision Gold Nanoparticles Using Turkevich Method. **Kona: powder science and technology in Japan**, v. 37, p. 224–232, 10 jan. 2020a.

DONG, W. et al. TRIM3 attenuates apoptosis in Parkinson's disease via activating PI3K/AKT signal pathway. **Aging (Albany NY)**, v. 13, n. 1, p. 735–749, 30 nov. 2020b.

DONG, X. Current Strategies for Brain Drug Delivery. **Theranostics**, v. 8, n. 6, p. 1481–1493, 2018.

DRESSELHAUS, M. S.; DRESSELHAUS, G.; AVOURIS, P. **Carbon Nanotubes: Synthesis, Structure, Properties, and Applications**. [s.l.] Springer Science & Business Media, 2001.

DRIDI, N. et al. Probing Protein Corona Formation around Gold Nanoparticles: Effects of Surface Coating. **ACS Nano**, v. 18, n. 12, p. 8649–8662, 26 mar. 2024.

- DU, B. et al. Glomerular barrier behaves as an atomically precise bandpass filter in a sub-nanometre regime. **Nature Nanotechnology**, v. 12, n. 11, p. 1096–1102, nov. 2017.
- DZIEDZIC, T. Systemic inflammation as a therapeutic target in acute ischemic stroke. **Expert Review of Neurotherapeutics**, v. 15, n. 5, p. 523–531, maio 2015.
- EL ASSAR, M.; ANGULO, J.; RODRÍGUEZ-MAÑAS, L. Oxidative stress and vascular inflammation in aging. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 65, p. 380–401, dez. 2013.
- ELAHI, N.; KAMALI, M.; BAGHERSAD, M. H. Recent biomedical applications of gold nanoparticles: A review. **Talanta**, v. 184, p. 537–556, 1 jul. 2018.
- EL-SAYED, Y.; YOUSSEF, E.; SHALABY, T. **Effect of gold nanoparticles on cerebral damage in rat model of ischemia reperfusion injury**. 1 out. 2017.
- ELTZSCHIG, H. K.; ECKLE, T. Ischemia and reperfusion—from mechanism to translation. **Nature Medicine**, v. 17, n. 11, p. 1391–1401, 7 nov. 2011.
- FAN, J.; CHENG, Y.; SUN, M. Functionalized Gold Nanoparticles: Synthesis, Properties and Biomedical Applications. **The Chemical Record**, v. 20, n. 12, p. 1474–1504, 2020.
- FARKOUH, A. et al. Sex-Related Differences in Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Frequently Prescribed Drugs: A Review of the Literature. **Advances in Therapy**, v. 37, n. 2, p. 644–655, 1 fev. 2020.
- FERREIRA, J. P. et al. Gold Nanoparticles Improve Clinical Parameters and Reduce Neurological Alterations in Sepsis-Induced Mice. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 19, n. 1, p. 182–193, 1 jan. 2023.
- FERRIGNO, A. et al. Selective Blockade of the Metabotropic Glutamate Receptor mGluR5 Protects Mouse Livers in In Vitro and Ex Vivo Models of Ischemia Reperfusion Injury. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 2, p. 314, 23 jan. 2018.
- FEYNMAN, R. P. There's Plenty of Room at the Bottom. **Engineering and Science**, v. 23, n. 5, p. 22–36, 1 fev. 1960.
- FURUKAWA, K. et al. The actin-severing protein gelsolin modulates calcium channel and NMDA receptor activities and vulnerability to excitotoxicity in hippocampal neurons. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 17, n. 21, p. 8178–8186, 1 nov. 1997.
- GARCIA-ETXARRI, A.; YUSTE, R. Time for NanoNeuro. **Nature Methods**, v. 18, n. 11, p. 1287–1293, nov. 2021.
- GHAZY, E. et al. Nanomaterials for Parkinson disease: Recent progress. **Journal of Molecular Structure**, v. 1231, p. 129698, 5 maio 2021.
- GINER-CASARES, J. J. et al. Inorganic nanoparticles for biomedicine: where materials scientists meet medical research. **Materials Today**, v. 19, n. 1, p. 19–28, 1 jan. 2016.
- GONÇALVES, S. C. A. et al. Alamandine Induces Neuroprotection in Ischemic Stroke Models. **Current Medicinal Chemistry**, v. 29, n. 19, p. 3483–3498, 1 jun. 2022.
- GONG, Z. et al. Mechanisms of immune response and cell death in ischemic stroke and their regulation by natural compounds. **Frontiers in Immunology**, v. 14, 11 jan. 2024.

GONTIJO, R. N. et al. Quantifying (n,m) species in single-wall carbon nanotubes dispersions by combining Raman and optical absorption spectroscopies. **Carbon**, v. 115, p. 681–687, 1 maio 2017.

GRASSO, G.; ZANE, D.; DRAGONE, R. Microbial Nanotechnology: Challenges and Prospects for Green Biocatalytic Synthesis of Nanoscale Materials for Sensoristic and Biomedical Applications. **Nanomaterials**, v. 10, n. 1, p. 11, jan. 2020.

GROMNICOVA, R. et al. Glucose-coated gold nanoparticles transfer across human brain endothelium and enter astrocytes in vitro. **PloS One**, v. 8, n. 12, p. e81043, 2013.

GROTTA, J. C.; HELGASON, C. Ischemic stroke pathophysiology. **Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases: The Official Journal of National Stroke Association**, v. 8, n. 3, p. 114–116, 1999.

GUPTA, V. et al. Nanotechnology in Cosmetics and Cosmeceuticals—A Review of Latest Advancements. **Gels**, v. 8, n. 3, p. 173, mar. 2022.

HAMID, R. et al. Comparison of alamar blue and MTT assays for high through-put screening. *Toxicology in Vitro*, v. 18, n. 5, p. 703–710, 1 out. 2004.

HANIU, H. et al. Culture medium type affects endocytosis of multi-walled carbon nanotubes in BEAS-2B cells and subsequent biological response. *Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA*, v. 27, n. 6, p. 1679–1685, set. 2013.

HANKEY, G. J. Stroke. *Lancet (London, England)*, v. 389, n. 10069, p. 641–654, 11 fev. 2017.

HARATI, R. et al. Susceptibility of juvenile and adult blood-brain barrier to endothelin-1: regulation of P-glycoprotein and breast cancer resistance protein expression and transport activity. *Journal of Neuroinflammation*, v. 9, p. 273, 19 dez. 2012.

HARNOD, T.; LIN, C.-L.; KAO, C.-H. Risk of Suicide Attempt in Poststroke Patients: A Population-Based Cohort Study. **Journal of the American Heart Association**, v. 7, n. 2, p. e007830, 10 jan. 2018.

HARPER, B. et al. The Impact of Surface Ligands and Synthesis Method on the Toxicity of Glutathione-Coated Gold Nanoparticles. **Nanomaterials**, v. 4, n. 2, p. 355–371, jun. 2014.

HAWKINS, B. T.; DAVIS, T. P. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacological Reviews*, v. 57, n. 2, p. 173–185, jun. 2005.

HAYAKAWA, K. et al. Transfer of mitochondria from astrocytes to neurons after stroke. *Nature*, v. 535, n. 7613, p. 551–555, 27 jul. 2016.

HERSH, A. M.; ALOMARI, S.; TYLER, B. M. Crossing the Blood-Brain Barrier: Advances in Nanoparticle Technology for Drug Delivery in Neuro-Oncology. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, n. 8, p. 4153, jan. 2022.

HIRN, S. et al. Particle size-dependent and surface charge-dependent biodistribution of gold nanoparticles after intravenous administration. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, Biological Barriers*. v. 77, n. 3, p. 407–416, 1 abr. 2011.

HOSSMANN, K. A. Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Annals of Neurology*, v. 36, n. 4, p. 557–565, out. 1994.

HUANG, H. et al. Gold Nanoparticles: Construction for Drug Delivery and Application in Cancer Immunotherapy. *Pharmaceutics*, v. 15, n. 7, p. 1868, jul. 2023.

HUANG, X.; EL-SAYED, M. A. Gold nanoparticles: Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy. *Journal of Advanced Research*, v. 1, n. 1, p. 13–28, 1 jan. 2010.

HYEON, S. J. et al. Dysfunction of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) triggers neuropathological processes via altered p53 activity in Huntington's disease. *Progress in Neurobiology*, v. 204, p. 102110, 1 set. 2021.

IADECOLA, C. The Neurovascular Unit Coming of Age: A Journey through Neurovascular Coupling in Health and Disease. *Neuron*, v. 96, n. 1, p. 17–42, 27 set. 2017.

IJIMA, S. Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature*, v. 354, n. 6348, p. 56–58, nov. 1991.

IRVIN-CHOY, N. S. et al. Gold nanoparticle biodistribution in pregnant mice following intravenous administration varies with gestational age. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, v. 36, p. 102412, 1 ago. 2021.

ISKUSNYKH, I. Y.; ZAKHAROVA, A. A.; PATHAK, D. Glutathione in Brain Disorders and Aging. *Molecules*, v. 27, n. 1, p. 324, jan. 2022.

ISLAM, N. U. et al. Green synthesis and biological activities of gold nanoparticles functionalized with *Salix alba*. *Arabian Journal of Chemistry*, v. 12, n. 8, p. 2914–2925, 1 dez. 2019.

IVERSON, N. M. et al. In Vivo Biosensing Via Tissue Localizable Near Infrared Fluorescent Single Walled Carbon Nanotubes. *Nature nanotechnology*, v. 8, n. 11, p. 873–880, nov. 2013.

JABIR, M. et al. Linalool-Loaded Glutathione-Modified Gold Nanoparticles Conjugated with CALNN Peptide as Apoptosis Inducer and NF- κ B Translocation Inhibitor in SKOV-3 Cell Line. *International Journal of Nanomedicine*, v. 15, p. 9025–9047, 17 nov. 2020.

JANG, G. J. et al. Size Dependence Unveiling the Adsorption Interaction of High- Density Lipoprotein Particles with PEGylated Gold Nanoparticles in Biomolecular Corona Formation. *Langmuir*, v. 37, n. 32, p. 9755–9763, 17 ago. 2021.

JIA, Y.-P. et al. The in vitro and in vivo toxicity of gold nanoparticles. **Chinese Chemical Letters**, v. 28, n. 4, p. 691–702, 1 abr. 2017.

JIANG, T. et al. Toxicity of single-walled carbon nanotubes (SWCNTs): effect of lengths, functional groups and electronic structures revealed by a quantitative toxicogenomics assay. *Environmental Science: Nano*, v. 7, n. 5, p. 1348–1364, 22 maio 2020.

JIANG, X. et al. Blood-brain barrier dysfunction and recovery after ischemic stroke. **Progress in Neurobiology**, v. 163–164, p. 144–171, 2018.

JIN, X.-X. et al. Elevated lactate dehydrogenase predicts poor prognosis of acute ischemic stroke. **PLOS ONE**, v. 17, n. 10, p. e0275651, 7 out. 2022.

JINGYUE, Z.; BERND, F. **Synthesis of gold nanoparticles via chemical reduction methods**. 2015.

KATSURA, K.; KRISTIÁN, T.; SIESJÖ, B. K. Energy metabolism, ion homeostasis, and cell damage in the brain. **Biochemical Society Transactions**, v. 22, n. 4, p. 991–996, nov. 1994.

KE, Y. et al. Photosynthesized gold nanoparticles from *Catharanthus roseus* induces caspase- mediated apoptosis in cervical cancer cells (HeLa). **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 47, n. 1, p. 1938–1946, 4 dez. 2019.

KEANEY, J.; CAMPBELL, M. The dynamic blood-brain barrier. **The FEBS journal**, v. 282, n. 21, p. 4067–4079, nov. 2015.

KERR, J. F.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide- ranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**, v. 26, n. 4, p. 239–257, ago. 1972.

KHATRI, D. K. et al. Nanotechnological Advances for Nose to Brain Delivery of Therapeutics to Improve the Parkinson Therapy. **Current Neuropharmacology**, v. 21, n. 3, p. 493–516, 8 mar. 2023.

KIM, S. et al. Intercellular Bioimaging and Biodistribution of Gold Nanoparticle- Loaded Macrophages for Targeted Drug Delivery. **Electronics**, v. 9, n. 7, p. 1105, jul. 2020.

KINDY, M. S.; BHAT, A. N.; BHAT, N. R. Transient ischemia stimulates glial fibrillary acid protein and vimentin gene expression in the gerbil neocortex, striatum and hippocampus. *Molecular Brain Research*, v. 13, n. 3, p. 199–206, 1 abr. 1992.

KNITTEL, L. L. et al. Ultrasmall Gold Nanoparticles Coated with Zwitterionic Glutathione Monoethyl Ester: A Model Platform for the Incorporation of Functional Peptides. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 124, n. 19, p. 3892–3902, 14 maio 2020.

KORKMAZ, A. et al. Exposure Time Related Oxidative Action of Hyperbaric Oxygen in Rat Brain. **Neurochemical Research**, v. 33, n. 1, p. 160–166, 1 jan. 2008.

KOSTANDY, B. B. The role of glutamate in neuronal ischemic injury: the role of spark in fire. **Neurological Sciences: Official Journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology**, v. 33, n. 2, p. 223–237, abr. 2012.

KOUSHKI, E. Effect of conjugation with organic molecules on the surface plasmon resonance of gold nanoparticles and application in optical biosensing. **RSC Advances**, v. 11, n. 38, p. 23390–23399, 2021.

KOZICS, K. et al. Pharmacokinetics, Biodistribution, and Biosafety of PEGylated Gold Nanoparticles In Vivo. **Nanomaterials**, v. 11, n. 7, p. 1702, jul. 2021.

KREIBIG, U.; FRAGSTEIN, C. V. The limitation of electron mean free path in small silver particles. **Zeitschrift für Physik**, v. 224, n. 4, p. 307–323, 1 ago. 1969.

KROTO, H. W. et al. C60: Buckminsterfullerene. **Nature**, v. 318, n. 6042, p. 162–163, nov. 1985.

KRUSS, S. et al. Carbon nanotubes as optical biomedical sensors. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Carbon Nanotubes in Medicine and Biology: Therapy and Diagnostics & Safety and Toxicology. v. 65, n. 15, p. 1933–1950, 1 dez. 2013.

KRUSS, S. et al. High-resolution imaging of cellular dopamine efflux using a fluorescent nanosensor array. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 8, p. 1789–1794, 21 fev. 2017.

KUMAR, M. et al. Nanoparticle biodistribution coefficients: A quantitative approach for understanding the tissue distribution of nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 194, p. 114708, 1 mar. 2023a.

- KUMAR, M. et al. Nanoparticle biodistribution coefficients: A quantitative approach for understanding the tissue distribution of nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 194, p. 114708, 1 mar. 2023b.
- KUPPUSAMY, P. et al. Biosynthesis of metallic nanoparticles using plant derivatives and their new avenues in pharmacological applications – An updated report. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 24, n. 4, p. 473–484, 1 jul. 2016.
- KYLE, S.; SAHA, S. Nanotechnology for the detection and therapy of stroke. **Advanced Healthcare Materials**, v. 3, n. 11, p. 1703–1720, nov. 2014.
- LANGEN, U. H.; AYLOO, S.; GU, C. Development and Cell Biology of the Blood-Brain Barrier. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 35, p. 591–613, 6 out. 2019.
- LAURENT, G. et al. Characterization and biodistribution of Au nanoparticles loaded in PLGA nanocarriers using an original encapsulation process. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 205, p. 111875, 1 set. 2021.
- LEE, K. X. et al. Recent Developments in the Facile Bio-Synthesis of Gold Nanoparticles (AuNPs) and Their Biomedical Applications. **International Journal of Nanomedicine**, v. 15, p. 275–300, 2020.
- LEITE, H. R. et al. Swim training attenuates oxidative damage and promotes neuroprotection in cerebral cortical slices submitted to oxygen glucose deprivation. **Journal of Neurochemistry**, v. 123, n. 2, p. 317–324, out. 2012.
- LESZEK, J. et al. Nanotechnology for Alzheimer Disease. **Current Alzheimer Research**, v. 14, n. 11, p. 1182–1189, 1 nov. 2017.
- LI, J. et al. Highly sensitive and selective colorimetric and SERS dual-mode detection of arsenic (III) based on glutathione functionalized gold nanoparticles. **Sensors and Actuators Reports**, v. 2, n. 1, p. 100013, 1 nov. 2020a.
- LI, L. et al. Oridonin ameliorates caspase-9-mediated brain neuronal apoptosis in mouse with ischemic stroke by inhibiting RIPK3-mediated mitophagy. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 44, n. 4, p. 726–740, abr. 2023.
- LI, R. et al. Green synthesis of gold nanoparticles from the extract of *Crocus sativus* to study the effect of antidepressant in adolescence and to observe its aggressive and impulsive behavior in rat models. **South African Journal of Botany**, v. 165, p. 455–465, 1 fev. 2024.
- LI, S.-D.; HUANG, L. Stealth Nanoparticles: High Density but Sheddable PEG is a Key for Tumor Targeting. **Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society**, v. 145, n. 3, p. 178–181, 3 ago. 2010.
- LI, X. et al. The systematic evaluation of size-dependent toxicity and multi-time biodistribution of gold nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 167, p. 260–266, 1 jul. 2018.
- LI, X. et al. Surface chemistry governs the sub-organ transfer, clearance and toxicity of functional gold nanoparticles in the liver and kidney. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 18, n. 1, p. 45, 14 mar. 2020b.

- LI, X. et al. Cerium oxide nanoparticles with antioxidative neurorestoration for ischemic stroke. **Biomaterials**, v. 291, p. 121904, dez. 2022.
- LI, Z. et al. A preparation of Ginkgo biloba L. leaves extract inhibits the apoptosis of hippocampal neurons in post-stroke mice via regulating the expression of Bax/Bcl-2 and Caspase-3. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 280, p. 114481, 15 nov. 2021.
- LIM, I.-I. S. et al. Interparticle Interactions in Glutathione Mediated Assembly of Gold Nanoparticles. **Langmuir**, v. 24, n. 16, p. 8857–8863, 1 ago. 2008.
- LINK, S.; EL-SAYED, M. A. Size and Temperature Dependence of the Plasmon Absorption of Colloidal Gold Nanoparticles. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 103, n. 21, p. 4212–4217, 1 maio 1999.
- LIU, T. et al. Imbalanced GSH/ROS and sequential cell death. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 36, n. 1, p. e22942, jan. 2022.
- LIU, X. et al. Surface and Size Effects on Cell Interaction of Gold Nanoparticles with Both Phagocytic and Nonphagocytic Cells. **Langmuir**, v. 29, n. 29, p. 9138–9148, 23 jul. 2013a.
- LIU, X.-Y. et al. Gold nanoparticles: synthesis, physiochemical properties and therapeutic applications in cancer. **Drug Discovery Today**, v. 26, n. 5, p. 1284–1292, 1 maio 2021.
- LIU, Z. et al. An intrinsic therapy of gold nanoparticles in focal cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 9, n. 6, p. 1017–1028, jun. 2013b.
- LIU, Z. et al. Application of inductively coupled plasma mass spectrometry in the study of apoptosis: determination of caspase-3 using a gold nanoparticle tag. **Analyst**, v. 141, n. 3, p. 926–933, 25 jan. 2016.
- LOPEZ-CHAVES, C. et al. Gold nanoparticles: Distribution, bioaccumulation and toxicity. In vitro and in vivo studies. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 14, n. 1, p. 1–12, jan. 2018.
- LOSSI, L. The concept of intrinsic versus extrinsic apoptosis. **Biochemical Journal**, v. 479, n. 3, p. 357–384, 11 fev. 2022.
- LOVE, S. Apoptosis and brain ischaemia. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 27, n. 2, p. 267–282, abr. 2003.
- LU, S. C. Regulation of glutathione synthesis. Em: STADTMAN, E. R.; CHOCK, P. B. (Eds.). **Current Topics in Cellular Regulation**. [s.l.] Academic Press, 2001. v. 36p. 95–116.
- LU, S. C. Regulation of glutathione synthesis. **Molecular Aspects of Medicine, Glutathione in Health and Disease**. v. 30, n. 1, p. 42–59, 1 fev. 2009.
- LUO, D. et al. Recent Development of Gold Nanoparticles as Contrast Agents for Cancer Diagnosis. **Cancers**, v. 13, n. 8, p. 1825, jan. 2021.
- LV, W. et al. Bioengineered Boronic Ester Modified Dextran Polymer Nanoparticles as Reactive Oxygen Species Responsive Nanocarrier for Ischemic Stroke Treatment. **ACS Nano**, v. 12, n. 6, p. 5417–5426, 26 jun. 2018.
- MA, Y.; HONG, J.; DING, Y. Biological Behavior Regulation of Gold Nanoparticles via the Protein Corona. **Advanced Healthcare Materials**, v. 9, n. 6, p. 1901448, 2020.

MAHESWARAN, R.; SHANMUGAVEL, B. P. A Critical Review of the Role of Carbon Nanotubes in the Progress of Next-Generation Electronic Applications. **Journal of Electronic Materials**, v. 51, n. 6, p. 2786–2800, 1 jun. 2022.

MALIK, S.; MUHAMMAD, K.; WAHEED, Y. Nanotechnology: A Revolution in Modern Industry. **Molecules**, v. 28, n. 2, p. 661, jan. 2023.

MANN, F. A. et al. Tuning Selectivity of Fluorescent Carbon Nanotube-Based Neurotransmitter Sensors. **Sensors**, v. 17, n. 7, p. 1521, jul. 2017.

MANN, F. A. et al. Quantum defects as versatile anchors for carbon nanotube functionalization. **Nature Protocols**, v. 17, n. 3, p. 727–747, mar. 2022.

MANZANERO, S.; SANTRO, T.; ARUMUGAM, T. V. Neuronal oxidative stress in acute ischemic stroke: sources and contribution to cell injury. **Neurochemistry International**, v. 62, n. 5, p. 712–718, abr. 2013.

MAO, R. et al. Neuronal Death Mechanisms and Therapeutic Strategy in Ischemic Stroke. **Neuroscience Bulletin**, v. 38, n. 10, p. 1229–1247, 1 out. 2022.

MAO, X.; LI, Z.-P.; TANG, Z.-Y. One pot synthesis of monodispersed L- glutathione stabilized gold nanoparticles for the detection of Pb²⁺ ions. **Frontiers of Materials Science**, v. 5, n. 3, p. 322–328, 1 set. 2011.

MARKERT, C. L. Lactate dehydrogenase. Biochemistry and function of lactate dehydrogenase. **Cell biochemistry and function**, v. 2, n. 3, p. 131–134, 1984a.

MARKERT, C. L. Lactate dehydrogenase. Biochemistry and function of lactate dehydrogenase. **Cell Biochemistry and Function**, v. 2, n. 3, p. 131–134, jul. 1984b.

MASSENSINI, A. R. et al. Alpha- and beta-scorpion toxins evoke glutamate release from rat cortical synaptosomes with different effects on [Na⁺]_i and [Ca²⁺]_i. **Neuropharmacology**, v. 37, n. 3, p. 289–297, 1998.

MAYER, S. A.; RINCON, F. Treatment of intracerebral haemorrhage. **The Lancet. Neurology**, v. 4, n. 10, p. 662–672, out. 2005.

MCCONNELL, H. L.; MISHRA, A. Cells of the Blood-brain Barrier: an Overview of the Neurovascular Unit in Health and Disease. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 2492, p. 3–24, 2022.

MIESZAWSKA, A. J. et al. Multifunctional Gold Nanoparticles for Diagnosis and Therapy of Disease. **Molecular Pharmaceutics**, v. 10, n. 3, p. 831–847, 4 mar. 2013.

MIKHED, Y.; DAIBER, A.; STEVEN, S. Mitochondrial Oxidative Stress, Mitochondrial DNA Damage and Their Role in Age-Related Vascular Dysfunction. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 7, p. 15918–15953, 13 jul. 2015.

MILAN, J.; NIEMCZYK, K.; KUS-LIŚKIEWICZ, M. Treasure on the Earth—Gold Nanoparticles and Their Biomedical Applications. **Materials**, v. 15, n. 9, p. 3355, 7 maio 2022.

MOSKOWITZ, M. A.; LO, E. H.; IADECOLA, C. The Science of Stroke: Mechanisms in Search of Treatments. **Neuron**, v. 67, n. 2, p. 181–198, 29 jul. 2010.

MOURÃO, F. A. G. et al. Neuroprotective effect of exercise in rat hippocampal slices submitted to in vitro ischemia is promoted by decrease of glutamate release and pro-apoptotic markers. **Journal of Neurochemistry**, v. 131, n. 1, p. 65–73, 2014.

MULLER, A. P. et al. Gold nanoparticles prevent cognitive deficits, oxidative stress and inflammation in a rat model of sporadic dementia of Alzheimer's type. **Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications**, v. 77, p. 476–483, 1 ago. 2017.

MÜNZEL, T. et al. Vascular consequences of endothelial nitric oxide synthase uncoupling for the activity and expression of the soluble guanylyl cyclase and the cGMP-dependent protein kinase. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 25, n. 8, p. 1551–1557, ago. 2005.

NARAYANAN, K. B.; SAKTHIVEL, N. Coriander leaf mediated biosynthesis of gold nanoparticles. **Materials Letters**, v. 62, n. 30, p. 4588–4590, 15 dez. 2008.

NAZARIAN, S. et al. Mesenchymal stem cells with modafinil (gold nanoparticles) significantly improves neurological deficits in rats after middle cerebral artery occlusion. **Experimental Brain Research**, v. 238, n. 11, p. 2589–2601, 1 nov. 2020.

NEJATI, K. et al. Biomedical Applications of Functionalized Gold Nanoparticles: A Review. **Journal of Cluster Science**, v. 33, n. 1, p. 1–16, 1 jan. 2022.

NGUYEN, T. H. A. et al. Novel biogenic silver and gold nanoparticles for multifunctional applications: Green synthesis, catalytic and antibacterial activity, and colorimetric detection of Fe(III) ions. **Chemosphere**, v. 287, p. 132271, 1 jan. 2022.

NICHOLLS, D. G.; SIHRA, T. S.; SANCHEZ-PRIETO, J. Calcium-Dependent and Independent Release of Glutamate from Synaptosomes Monitored by Continuous Fluorometry. **Journal of Neurochemistry**, v. 49, n. 1, p. 50–57, 1 jul. 1987.

NICHOLSON, D. W.; THORNBERRY, N. A. Caspases: killer proteases. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 22, n. 8, p. 299–306, ago. 1997.

NOVOSELOV, K. S. et al. Electric Field Effect in Atomically Thin Carbon Films. **Science**, v. 306, n. 5696, p. 666–669, 22 out. 2004.

O'CONNELL, M. J. et al. Band Gap Fluorescence from Individual Single-Walled Carbon Nanotubes. **Science**, v. 297, n. 5581, p. 593–596, 26 jul. 2002.

OLMO, I. G. et al. Zika Virus Promotes Neuronal Cell Death in a Non-Cell Autonomous Manner by Triggering the Release of Neurotoxic Factors. **Frontiers in Immunology**, v. 8, 23 ago. 2017.

ORRENIUS, S.; ZHIVOTOVSKY, B.; NICOTERA, P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 4, n. 7, p. 552–565, jul. 2003.

OZCICEK, I. et al. The effects of surface functionality and size of gold nanoparticles on neuronal toxicity, apoptosis, ROS production and cellular/suborgan biodistribution. **Materials Science and Engineering: C**, v. 128, p. 112308, 1 set. 2021.

PANAHZADEH, F.; MIRNASURI, R.; RAHMATI, M. Exercise and Syzygium aromaticum reverse memory deficits, apoptosis and mitochondrial dysfunction of the hippocampus in Alzheimer's disease. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 286, p. 114871, 25 mar. 2022.

- PEI, H. et al. An electrochemical chiral sensor based on glutamic acid functionalized graphene- gold nanocomposites for chiral recognition of tryptophan enantiomers. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 913, p. 116283, 15 maio 2022.
- PELAZ, B. et al. Surface Functionalization of Nanoparticles with Polyethylene Glycol: Effects on Protein Adsorption and Cellular Uptake. **ACS Nano**, v. 9, n. 7, p. 6996–7008, 28 jul. 2015.
- PEM, B. et al. Toxicity and safety study of silver and gold nanoparticles functionalized with cysteine and glutathione. **Beilstein Journal of Nanotechnology**, v. 10, n. 1, p. 1802–1817, 2 set. 2019.
- PINALS, R. L. et al. Quantitative Protein Corona Composition and Dynamics on Carbon Nanotubes in Biological Environments. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 59, n. 52, p. 23668–23677, 2020.
- POLTE, J. et al. Mechanism of gold nanoparticle formation in the classical citrate synthesis method derived from coupled in situ XANES and SAXS evaluation. **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, n. 4, p. 1296–1301, 3 fev. 2010.
- POLTE, J. Fundamental growth principles of colloidal metal nanoparticles – a new perspective. **CrystEngComm**, v. 17, n. 36, p. 6809–6830, 1 set. 2015.
- PONGSUCHART, M. et al. **Effect of Glutathione-Stabilized Gold Nanoparticles in 3T3 Fibroblast Cell**. 5 jan. 2012.
- POWERS, W. J. et al. 2018 Guidelines for the Early Management of Patients With Acute Ischemic Stroke: A Guideline for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. **Stroke**, v. 49, n. 3, p. e46–e110, mar. 2018.
- PRIMOŽIČ, M.; KNEZ, Ž.; LEITGEB, M. (Bio)Nanotechnology in Food Science—Food Packaging. **Nanomaterials**, v. 11, n. 2, p. 292, fev. 2021.
- RADAK, D. et al. Apoptosis and Acute Brain Ischemia in Ischemic Stroke. **Current Vascular Pharmacology**, v. 15, n. 2, p. 115–122, 1 mar. 2017.
- RAFII, M. S.; HILLIS, A. E. Compendium of cerebrovascular diseases. **International Review of Psychiatry (Abingdon, England)**, v. 18, n. 5, p. 395–407, out. 2006.
- RAMPADO, R. et al. Recent Advances in Understanding the Protein Corona of Nanoparticles and in the Formulation of <Stealthy> Nanomaterials. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, 3 abr. 2020.
- RATTAN, R. et al. A Mini-Review on Lichen-Based Nanoparticles and Their Applications as Antimicrobial Agents. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 633090, 12 mar. 2021.
- RAVELLI, D. et al. PEGylated carbon nanotubes: preparation, properties and applications. **RSC Advances**, v. 3, n. 33, p. 13569–13582, 30 jul. 2013.
- REESE, T. S.; KARNOVSKY, M. J. Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. **The Journal of Cell Biology**, v. 34, n. 1, p. 207–217, jul. 1967.
- REQUEJO, K. I.; LIOPO, A. V.; ZUBAREV, E. R. Gold Nanorod Synthesis with Small Thiolated Molecules. **Langmuir**, v. 36, n. 14, p. 3758–3769, 14 abr. 2020.
- RODRÍGUEZ-ARELLANO, J. J. et al. Astrocytes in physiological aging and Alzheimer's disease. **Neuroscience**, v. 323, p. 170–182, 26 maio 2016.

ROTHWELL, N. J.; HOPKINS, S. J. Cytokines and the nervous system II: Actions and mechanisms of action. **Trends in Neurosciences**, v. 18, n. 3, p. 130–136, mar. 1995.

ROTONDA, J. et al. The three-dimensional structure of apopain/CPP32, a key mediator of apoptosis. **Nature Structural Biology**, v. 3, n. 7, p. 619–625, jul. 1996.

SACCO, R. L. et al. Guidelines for prevention of stroke in patients with ischemic stroke or transient ischemic attack: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association Council on Stroke: co-sponsored by the Council on Cardiovascular Radiology and Intervention: the American Academy of Neurology affirms the value of this guideline. **Stroke**, v. 37, n. 2, p. 577–617, fev. 2006.

SANTHOSH, P. B.; GENOVA, J.; CHAMATI, H. Green Synthesis of Gold Nanoparticles: An Eco-Friendly Approach. **Chemistry**, v. 4, n. 2, p. 345–369, jun. 2022.

SARAIWA, C. et al. Nanoparticle-mediated brain drug delivery: Overcoming blood-brain barrier to treat neurodegenerative diseases. **Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society**, v. 235, p. 34–47, 10 ago. 2016.

SARFRAZ, N.; KHAN, I. Plasmonic Gold Nanoparticles (AuNPs): Properties, Synthesis and their Advanced Energy, Environmental and Biomedical Applications. **Chemistry – An Asian Journal**, v. 16, n. 7, p. 720–742, 2021.

SATAPATHY, M. K. et al. Solid Lipid Nanoparticles (SLNs): An Advanced Drug Delivery System Targeting Brain through BBB. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 8, p. 1183, ago. 2021.

SATHIYANARAYANAN, G. et al. Optimization of polyhydroxybutyrate production by marine *Bacillus megaterium* MSBN04 under solid state culture. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 60, p. 253–261, 1 set. 2013.

SELIM, M. E.; ABD-ELHAKIM, Y. M.; AL-AYADHI, L. Y. Pancreatic Response to Gold Nanoparticles Includes Decrease of Oxidative Stress and Inflammation In Autistic Diabetic Model. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 35, n. 2, p. 586–600, 27 jan. 2015.

SELIM, M.; HENDI, A. Gold Nanoparticles Induce Apoptosis in MCF-7 Human Breast Cancer Cells. **Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP**, v. 13, p. 1617–20, 30 abr. 2012.

SHAHEEN, T. I. Nanotechnology for modern textiles: highlights on smart applications. **The Journal of The Textile Institute**, v. 113, n. 10, p. 2274–2284, 26 set. 2022.

SHAJKUMAR, A. et al. Silica-supported Au@hollow-SiO₂ particles with outstanding catalytic activity prepared via block copolymer template approach. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 491, p. 246–254, 1 abr. 2017.

SHARIFI, M. et al. Plasmonic gold nanoparticles: Optical manipulation, imaging, drug delivery and therapy. **Journal of Controlled Release**, v. 311–312, p. 170–189, 1 out. 2019.

SHARIFI, M. et al. Application of thermal annealing-assisted gold nanoparticles for ultrasensitive diagnosis of pancreatic cancer using localized surface plasmon resonance. **Microchemical Journal**, v. 190, p. 108698, 1 jul. 2023.

SHARMA, D. et al. A Highly Sensitive Immunosensor Based on In Situ Reduced Gold-Chitosan Nanocomposite for Detection of Monosodium L-glutamate. **Journal of Biosystems Engineering**, v. 47, n. 1, p. 28–38, 1 mar. 2022.

SHARMA, N. et al. Exploitation of marine bacteria for production of gold nanoparticles. **Microbial Cell Factories**, v. 11, n. 1, p. 86, 20 jun. 2012.

SHENDE, P.; SARDESAI, M.; GAUD, R. S. Micro to nanoneedles: a trend of modernized transepidermal drug delivery system. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 46, n. 1, p. 19–25, 2 jan. 2018.

SHIRAKI, T. et al. Carbon Nanotube Photoluminescence Modulation by Local Chemical and Supramolecular Chemical Functionalization. **Accounts of Chemical Research**, v. 53, n. 9, p. 1846–1859, 15 set. 2020.

SIBUYI, N. R. S. et al. Multifunctional Gold Nanoparticles for Improved Diagnostic and Therapeutic Applications: A Review. **Nanoscale Research Letters**, v. 16, n. 1, p. 174, 5 dez. 2021.

SIMPSON, C. A. et al. In vivo toxicity, biodistribution, and clearance of glutathione-coated gold nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 9, n. 2, p. 257–263, 1 fev. 2013.

SINGH, A. K. et al. Green synthesis of gold nanoparticles from *Dunaliella salina*, its characterization and in vitro anticancer activity on breast cancer cell line. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 51, p. 164–176, 1 jun. 2019.

SINGH, S. et al. Focusing the pivotal role of nanotechnology in Huntington's disease: an insight into the recent advancements. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, n. 49, p. 73809–73827, 1 out. 2022.

SINISCALCHI, A. et al. Cerebral stroke injury: the role of cytokines and brain inflammation. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, v. 25, n. 2, p. 131–137, 1 maio 2014.

SODIPO, B. K.; MOHAMMED, Z. K. Advances in biodistribution of gold nanoparticles: the influence of size, surface charge, and route of administration. **Biomedical Materials**, v. 19, n. 4, p. 042010, jun. 2024.

SONAVANE, G.; TOMODA, K.; MAKINO, K. Biodistribution of colloidal gold nanoparticles after intravenous administration: Effect of particle size. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 66, n. 2, p. 274–280, 15 out. 2008a.

SONAVANE, G.; TOMODA, K.; MAKINO, K. Biodistribution of colloidal gold nanoparticles after intravenous administration: Effect of particle size. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 66, n. 2, p. 274–280, 15 out. 2008b.

SONG, Z. et al. Rod-Shaped Polymeric Nanoparticles Intervene Neutrophils for Efficient Ischemic Stroke Therapy. **Advanced Functional Materials**, v. 33, n. 19, p. 2212326, 2023.

SOTNIKOV, D. V. et al. Adsorption of proteins on gold nanoparticles: One or more layers? **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 173, p. 557–563, 1 jan. 2019.

SOUSA, A. A. et al. Synthesis, Characterization, and Direct Intracellular Imaging of Ultrasmall and Uniform Glutathione-Coated Gold Nanoparticles. **Small**, v. 8, n. 14, p. 2277–2286, 23 jul. 2012.

SOUSA, A. A. et al. Biointeractions of ultrasmall glutathione-coated gold nanoparticles: effect of small size variations. **Nanoscale**, v. 8, n. 12, p. 6577–6588, 17 mar. 2016a.

SOUSA, A. A. et al. Biointeractions of ultrasmall glutathione-coated gold nanoparticles: effect of small size variations. **Nanoscale**, v. 8, n. 12, p. 6577–6588, 17 mar. 2016b.

STELLER, H. Mechanisms and genes of cellular suicide. **Science (New York, N.Y.)**, v. 267, n. 5203, p. 1445–1449, 10 mar. 1995.

STRANO, M. S. (Invited) Corona Phase Molecular Recognition (CoPhMoRe) to Enable New Nanosensor Interfaces. **ECS Meeting Abstracts**, v. MA2015-01, n. 5, p. 753, 29 abr. 2015.

TERSTAPPEN, G. C. et al. Strategies for delivering therapeutics across the blood–brain barrier. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 20, n. 5, p. 362–383, maio 2021.

THAYABARANATHAN, T. et al. Global stroke statistics 2022. **International Journal of Stroke**, v. 17, n. 9, p. 946–956, 1 out. 2022.

THOMPSON, C. B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. **Science (New York, N.Y.)**, v. 267, n. 5203, p. 1456–1462, 10 mar. 1995.

THORNBERRY, N. A. et al. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. **Nature**, v. 356, n. 6372, p. 768–774, 30 abr. 1992.

THORNBERRY, N. A.; LAZEBNIK, Y. Caspases: enemies within. **Science (New York, N.Y.)**, v. 281, n. 5381, p. 1312–1316, 28 ago. 1998.

TLILI, I.; ALKANHAL, T. A. Nanotechnology for water purification: electrospun nanofibrous membrane in water and wastewater treatment. **Journal of Water Reuse and Desalination**, v. 9, n. 3, p. 232–248, 24 jan. 2019.

TOWFIGHI, A. et al. Poststroke Depression: A Scientific Statement for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. **Stroke**, v. 48, n. 2, p. e30–e43, fev. 2017.

TRUONG, V.-T. et al. Multi-walled carbon nanotubes of 200 nm diameter and carbon micro-balloons. 2010 International Conference on Nanoscience and Nanotechnology. **Anais...** Em: 2010 INTERNATIONAL CONFERENCE ON NANOSCIENCE AND NANOTECHNOLOGY. fev. 2010. Disponível em: <https://ieeexplore.ieee.org/abstract/document/6045178?casa_token=rv9656R9IuQAAAAA:79K5MJgO7vdcOSoAzWgj0atMTXq7oh_OdtdWnA5IAZhQ7ftTTjzL3gqk6PrcWXcyrOd1NEATR9A>. Acesso em: 31 jul. 2024

TSAO, C. W. et al. Heart Disease and Stroke Statistics—2023 Update: A Report From the American Heart Association. **Circulation**, v. 147, n. 8, 21 fev. 2023.

TSOI, K. M. et al. Mechanism of hard-nanomaterial clearance by the liver. **Nature Materials**, v. 15, n. 11, p. 1212–1221, nov. 2016.

TUO, Q.; ZHANG, S.; LEI, P. Mechanisms of neuronal cell death in ischemic stroke and their therapeutic implications. **Medicinal Research Reviews**, v. 42, n. 1, p. 259–305, 2022.

TURKEVICH, J.; STEVENSON, P. C.; HILLIER, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. **Discussions of the Faraday Society**, v. 11, n. 0, p. 55–75, 1 jan. 1951.

UPADHYAY, N. et al. Development of sensitive magnetic nanoparticle assisted rapid sandwich assay(s-MARSA) to monitor Parkinson's disease and Schizophrenia pharmacotherapy. **Analytical Biochemistry**, v. 667, p. 115082, 15 abr. 2023.

UZDENSKEY, A. B. Apoptosis regulation in the penumbra after ischemic stroke: expression of pro- and antiapoptotic proteins. *Apoptosis*, v. 24, n. 9, p. 687–702, 1 out. 2019.

VAISHANAV, S. K. et al. Protein nanoparticle interaction: A spectrophotometric approach for adsorption kinetics and binding studies. **Journal of Molecular Structure**, v. 1117, p. 300–310, 5 ago. 2016.

VALADÃO, K. M. G. et al. Nanotechnology in Improving the Treatment of Huntington's Disease: a Systematic Review. **Neurotoxicity Research**, v. 40, n. 2, p. 636–645, 1 abr. 2022.

VAN DEN ANKER, J. et al. Developmental Changes in Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 58, n. S10, p. S10–S25, 2018.

VERGARA-CASTAÑEDA, H. et al. Gold nanoparticles bio-reduced by natural extracts of arantho (*Kalanchoe daigremontiana*) for biological purposes: physicochemical, antioxidant and antiproliferative evaluations. **Materials Research Express**, v. 6, n. 5, p. 055010, fev. 2019.

VERMEHREN, P. et al. Cooperation between NMDA-Type Glutamate and P2 Receptors for Neuroprotection during Stroke: Combining Astrocyte and Neuronal Protection. *Neuroglia*, v. 1, n. 1, p. 30–47, set. 2018.

VIJAYAKUMAR, S.; GANESAN, S. In Vitro Cytotoxicity Assay on Gold Nanoparticles with Different Stabilizing Agents. **Journal of Nanomaterials**, v. 2012, p. e734398, 4 set. 2012.

VINLUAN, R. D. I. et al. Glutathione-Coated Luminescent Gold Nanoparticles: A Surface Ligand for Minimizing Serum Protein Adsorption. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 6, n. 15, p. 11829–11833, 13 ago. 2014.

WALKER, N. P. et al. Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)₂ homodimer. **Cell**, v. 78, n. 2, p. 343–352, 29 jul. 1994.

WANG, A. et al. High lactate dehydrogenase was associated with adverse outcomes in patients with acute ischemic stroke or transient ischemic attack. **Annals of Palliative Medicine**, v. 10, n. 10, p. 101850195–101810195, out. 2021.

WANG, H. et al. Exogenous glutathione exerts a therapeutic effect in ischemic stroke rats by interacting with intrastriatal dopamine. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 43, n. 3, p. 541–551, mar. 2022.

WANG, P. et al. Interaction of gold nanoparticles with proteins and cells. **Science and Technology of Advanced Materials**, v. 16, n. 3, p. 034610, 18 jun. 2015.

WANG, Y. et al. Biodegradable polymeric nanoparticles containing gold nanoparticles and Paclitaxel for cancer imaging and drug delivery using photoacoustic methods. **Biomedical Optics Express**, v. 7, n. 10, p. 4125–4138, 1 out. 2016.

WANG, Y. et al. Enhancement effect of p-iodophenol on gold nanoparticle-catalyzed chemiluminescence and its applications in detection of thiols and guanidine. **Talanta**, v. 182, p. 523–528, 15 maio 2018.

WESLEY, U. V. et al. Galectin-3 protects against ischemic stroke by promoting neuro-angiogenesis via apoptosis inhibition and Akt/Caspase regulation. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 41, n. 4, p. 857–873, 1 abr. 2021.

WESTERGAARD, E.; BRIGHTMAN, M. W. Transport of proteins across normal cerebral arterioles. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 152, n. 1, p. 17–44, 1 nov. 1973.

WILLIAMS, G. T.; SMITH, C. A. Molecular regulation of apoptosis: genetic controls on cell death. **Cell**, v. 74, n. 5, p. 777–779, 10 set. 1993.

WILSON, K. P. et al. Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme. **Nature**, v. 370, n. 6487, p. 270–275, 28 jul. 1994.

WINKLER, E. A.; BELL, R. D.; ZLOKOVIC, B. V. Central nervous system pericytes in health and disease. **Nature Neuroscience**, v. 14, n. 11, p. 1398–1405, 26 out. 2011.

WU, D. et al. The blood–brain barrier: structure, regulation, and drug delivery. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 8, n. 1, p. 1–27, 25 maio 2023.

WU, K.-J. et al. Green Tea Extract Ameliorates Learning and Memory Deficits in Ischemic Rats via Its Active Component Polyphenol Epigallocatechin-3-gallate by Modulation of Oxidative Stress and Neuroinflammation. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine: eCAM**, v. 2012, p. 163106, 2012.

WU, R. H. et al. A facile route to tailoring peptide-stabilized gold nanoparticles using glutathione as a synthon. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 19, n. 5, p. 6754–6775, 23 maio 2014.

WUTHSCHICK, M. et al. Turkevich in New Robes: Key Questions Answered for the Most Common Gold Nanoparticle Synthesis. **ACS Nano**, v. 9, n. 7, p. 7052–7071, 28 jul. 2015.

XU, H. et al. Micro/Nano Technology for Next-Generation Diagnostics. **Small Methods**, v. 4, n. 4, p. 1900506, 2020.

XU, H. et al. Neuritin has a neuroprotective role in the rat model of acute ischemia stroke by inhibiting neuronal apoptosis and NLRP3 inflammasome. **Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases**, v. 32, n. 12, p. 107391, 1 dez. 2023a.

XU, L. et al. Neuroprotective effects of autophagy inhibition on hippocampal glutamate receptor subunits after hypoxia-ischemia-induced brain damage in newborn rats. **Neural Regeneration Research**, v. 12, n. 3, p. 417–424, mar. 2017.

XU, M. et al. Size-Dependent In Vivo Transport of Nanoparticles: Implications for Delivery, Targeting, and Clearance. **ACS Nano**, v. 17, n. 21, p. 20825–20849, 14 nov. 2023b.

YABUKI, Y.; FUKUNAGA, K. Oral administration of glutathione improves memory deficits following transient brain ischemia by reducing brain oxidative stress. **Neuroscience**, v. 250, p. 394–407, 10 out. 2013.

YANG, B. et al. The characterization of the concentration of the single-walled carbon nanotubes in aqueous dispersion by UV-Vis-NIR absorption spectroscopy. **The Analyst**, v. 138, n. 21, p. 6671, 2013.

YANG, D. et al. Mitigation of Carbon Nanotube Neurosensor Induced Transcriptomic and Morphological Changes in Mouse Microglia with Surface Passivation. **ACS Nano**, v. 14, n. 10, p. 13794–13805, 27 out. 2020.

- YANG, S. J. et al. Synaptic scale dopamine disruption in Huntington's Disease model mice imaged with near infrared catecholamine nanosensors. *bioRxiv*, 21 set. 2022. Disponível em: <<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.09.19.508617v1>>. Acesso em: 31 jul. 2024.
- YU, Y. et al. Efficacy of Temozolomide-Conjugated Gold Nanoparticle Photothermal Therapy of Drug-Resistant Glioblastoma and Its Mechanism Study. **Molecular Pharmaceutics**, v. 19, n. 4, p. 1219–1229, 4 abr. 2022.
- YUAN, J. et al. The C. elegans cell death gene ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. **Cell**, v. 75, n. 4, p. 641–652, 19 nov. 1993.
- ZABETAKIS, K. et al. Effect of high gold salt concentrations on the size and polydispersity of gold nanoparticles prepared by an extended Turkevich–Frens method. **Gold Bulletin**, v. 45, n. 4, p. 203–211, 1 dez. 2012.
- ZEYNALOO, E. et al. Design of a mediator-free, non-enzymatic electrochemical biosensor for glutamate detection. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 31, p. 102305, 1 jan. 2021.
- ZHANG, C. et al. Progress, challenges, and future of nanomedicine. **Nano Today**, v. 35, p. 101008, 1 dez. 2020.
- ZHANG, J. et al. A rapid, direct, quantitative, and label-free detector of cardiac biomarker troponin T using near-infrared fluorescent single-walled carbon nanotube sensors. **Advanced Healthcare Materials**, v. 3, n. 3, p. 412–423, mar. 2014a.
- ZHANG, J.; CHEN, Z.; CHEN, Q. Advanced Nano-Drug Delivery Systems in the Treatment of Ischemic Stroke. **Molecules**, v. 29, n. 8, p. 1848, jan. 2024.
- ZHANG, J.; MOU, L.; JIANG, X. Surface chemistry of gold nanoparticles for health-related applications. **Chemical Science**, v. 11, n. 4, p. 923–936, 2020.
- ZHANG, L. et al. Research progress on the mechanism of curcumin in cerebral ischemia/reperfusion injury: a narrative review. **Apoptosis**, v. 28, n. 9, p. 1285–1303, 1 out. 2023.
- ZHANG, S. et al. Advanced drug delivery system against ischemic stroke. **Journal of Controlled Release**, v. 344, p. 173–201, 1 abr. 2022.
- ZHANG, T.-T. et al. Strategies for transporting nanoparticles across the blood-brain barrier. **Biomaterials Science**, v. 4, n. 2, p. 219–229, fev. 2016.
- ZHANG, X. et al. Advances in nanomedicines for diagnosis of central nervous system disorders. **Biomaterials**, v. 269, p. 120492, 1 fev. 2021.
- ZHANG, X.-D. et al. Enhanced tumor accumulation of sub-2 nm gold nanoclusters for cancer radiation therapy. **Advanced Healthcare Materials**, v. 3, n. 1, p. 133–141, jan. 2014b.
- ZHAO, J. et al. Activated astrocytes attenuate neocortical seizures in rodent models through driving Na⁺-K⁺-ATPase. **Nature Communications**, v. 13, p. 7136, 21 nov. 2022.
- ZHAO, X. et al. Exploring the diameter and surface dependent conformational changes in carbon nanotube-protein corona and the related cytotoxicity. **Journal of Hazardous Materials**, v. 292, p. 98–107, 15 jul. 2015.

ZHAO, Y. et al. Nano-liposomes of lycopene reduces ischemic brain damage in rodents by regulating iron metabolism. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 124, p. 1–11, 20 ago. 2018.

ZHAO, Y.; SULTAN, D.; LIU, Y. 2 - Biodistribution, Excretion, and Toxicity of Nanoparticles. Em: CUI, W.; ZHAO, X. (Eds.). Theranostic Bionanomaterials. **Micro and Nano Technologies**. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 27–53.

ZHENG, X. J.; CHOW, J. C. L. Radiation dose enhancement in skin therapy with nanoparticle addition: A Monte Carlo study on kilovoltage photon and megavoltage electron beams. **World Journal of Radiology**, v. 9, n. 2, p. 63–71, 28 fev. 2017.

ZHENG, Y. et al. Intrinsic Effects of Gold Nanoparticles on Oxygen-Glucose Deprivation/Reperfusion Injury in Rat Cortical Neurons. **Neurochemical Research**, v. 44, n. 7, p. 1549–1566, jul. 2019a.

ZHENG, Y. et al. Intrinsic Effects of Gold Nanoparticles on Oxygen-Glucose Deprivation/Reperfusion Injury in Rat Cortical Neurons. **Neurochemical Research**, v. 44, n. 7, p. 1549–1566, jul. 2019b.

ZHOU, C. et al. Luminescent Gold Nanoparticles with Mixed Valence States Generated from Dissociation of Polymeric Au(I) Thiolates. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 114, n. 17, p. 7727–7732, 6 maio 2010.

ZHOU, Y. et al. Genetic analysis of tissue glutathione concentrations and redox balance. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 71, p. 157–164, jun. 2014.

<A emoção de aprender separa a juventude da velhice. Enquanto você estiver aprendendo, você não está velho.=

Rosalyn Sussman Yalow

Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina, 1977

8 ANEXO 1: Cálculo de moléculas de GSH ligadas a uma AuNP

$$D = 10 \text{ nm} \quad MM(\text{GSH}) = 307,33 \text{ g/mol}$$

$$MM(\text{Au}) = 197 \text{ g/mol} \quad MM(\text{HAuCl}_4) = 340 \text{ g/mol} \quad \rho \text{ Au} = 19,3 \text{ g}/10^{-6} \text{ m}^3$$

(densidade do ouro)

$$\text{Equação da área da esfera} = 4\pi R^2$$

$$\text{Equação do volume da esfera} = 4/3\pi R^3$$

$$\text{Equação considerando uma área } 6\text{cm} \times 6\text{cm} \rightarrow S_f = 36 D^2$$

1) Área da esfera (SNP)

$$SNP = 4\pi R^2 =$$

$$4\pi(D/2)^2 = \pi D^2 \text{ SNP}$$

$$= 3,14 \times (10 \times 10^{-9})^2$$

$$SNP = 314 \times 100 \times 10^{-18}$$

$$\text{SNP} = 314 \times 10^{-18} \text{ m}^2$$

2) Massa de Au na

solução Vpipetada =

$$250\mu\text{L} \quad M =$$

$$0,1\text{mol/L}$$

$$m\text{HAuCl}_4 = 250 \times 10^{-6}\text{L} \times 0,1\text{mol/L} =$$

$$25 \times 10^{-6} \text{ mol } m\text{Au} = 0,57 \times 25 \times 10^{-6}$$

$$\text{mol} = 14,25 \times 10^{-6} \text{ mol}$$

$$m\text{Au} = 197 \text{ g/mol} \times 14,25 \times 10^{-6} \text{ mol} = 2.807,25 \times 10^{-6} \text{ g}$$

$$m\text{Au} = 2,8 \times 10^{-3} \text{ g}$$

$$\text{mAu} = 2,8 \text{ mg de Au}$$

3) Volume da esfera (VNP)

$$VNP = 4/3\pi(D/2)^3 = 1/6\pi D^3$$

$$VNP = 1/6 \times 3 (10 \times$$

$$10^{-9})^3 \text{ m}^3 \quad VNP = 3/6$$

$$\times 1000 \times 10^{-27} \text{ m}^3$$

$$VNP = 0,5 \times 1 \times 10^3$$

$$\times 10^{-27} \text{ m}^3$$

$$\mathbf{VNP = 0,5 \times 10^{-24} \text{ m}^3}$$

4) Massa da NP

$$\rho = 19,3\text{g}/10^{-6}\text{m}^3 = 19,3 \times 10^6$$

$$\text{m}^3 \quad \text{mNP} = 19,3 \times 10^6$$

$$\text{g}/\text{m}^3 \times 0,5 \times 10^{-24} \text{ m}^3$$

$$\mathbf{mNP = 9,65 \times 10^{-18} \text{ g}}$$

5) Número de NPs (NNP)

$$NNP = (2,8 \times 10^{-3}\text{g}) / (9,65 \times 10^{-18}\text{g}) = 0,29 \times 10^{-3} \times 10^{18}$$

$$NNP = 0,29 \times 10^{15} \text{ NPs}$$

$$\mathbf{NNP = 2,9 \times 10^{14} \text{ NPs}}$$

6) Área total para

$$\text{GSH (St) St} =$$

$$NNP \times \text{SNP}$$

$$\text{St} = 2,9 \times 10^{14} \times 314 \times 10^{-18} \text{ m}^2$$

$$\mathbf{St = 910,6 \times 10^{-4} \text{ m}^2}$$

$$\mathbf{St = 9,10 \times 10^{-2} \text{ m}^2 \text{ (área disponível)}}$$

7) Diâmetro médio do GSH

$$Vm = (307 \text{ g/mol}) / (1 \text{ g/cm}^3) = 307 \text{ mol} / \text{cm}^3 \quad Vm = 1/6\pi D^3$$

$$D = \sqrt[3]{\frac{Vm}{No}} = \sqrt[3]{\frac{307}{6 \times 10^{23}}} = \sqrt[3]{\frac{514}{6 \times 10^{23}}} = \sqrt[3]{102 \times 10^{-23}}$$

$$D = \sqrt[3]{10,2 \times 10^{-24}} = \sqrt[3]{10,2} \times 10^{-8}$$

$$\mathbf{D = 2,15 \times 10^{-8} \text{ cm}}$$

8) Área para cada molécula de

$$\text{GSH (Sf) } Sf = 36 D^2$$

$$Sf = 36 \times (2,15 \times 10^{-8})^2 \text{ cm} = 36 \times 4,6 \times 10^{-16} \text{ cm}^2$$

$$Sf = 165,6 \times 10^{-16}$$

$$\mathbf{Sf = 1,65 \times 10^{-14} \text{ cm}^2 \text{ (área necessária para 1 molécula de GSH)}}$$

9) Número de áreas dispostas para GSH

$$Nq = St/Sf = (9,10 \times 10^{-2} \text{ m}^2) \times (1,65 \times 10^{-4} \text{ m}^2)$$

$$Nq = 5,51 \times 10^{-2} \times 10^{14} \times 10^4$$

$$\mathbf{Nq = 5,51 \times 10^{16}}$$

10) Total de moléculas de GSH por NP (Nq /

$$\text{número de NPs) } \text{GSH/NP} = 5,51 \times 10^{16} / 2,9 \times 10^{14}$$

$$\text{GSH/NP} = 1,9 \times 10^2$$

$$\mathbf{\text{GSH/NP} = 190 \text{ moléculas de GSH por NP}}$$

9 ANEXO 2: Documentos do comitê de ética em uso de animais



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Ações antioxidantes do fulerol funcionalizado com ácido lipoico em um modelo de isquemia cerebral", protocolo do CEUA: 270/2020 sob a responsabilidade de Andre Ricardo Massensini que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 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 da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 08/02/2021.

Vigência da Autorização	08/02/2021 a 07/02/2026
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/linhagem	Camundongo heterogênico / CD1
Nº de animais	20
Peso/Idade	35g / 8(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo heterogênico / CD1
Nº de animais	20
Peso/Idade	35g / 8(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo heterogênico / CD1
Nº de animais	20
Peso/Idade	35g / 8(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo heterogênico / CD1
Nº de animais	20
Peso/Idade	35g / 8(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo heterogênico / CD1
Nº de animais	20
Peso/Idade	35g / 8(semanas)

Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo heterogênico / CD1
Nº de animais	20
Peso/Idade	35g / 8(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo heterogênico / CD1
Nº de animais	20
Peso/Idade	35g / 8(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo heterogênico / CD1
Nº de animais	20
Peso/Idade	35g / 8(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo heterogênico / CD1
Nº de animais	20
Peso/Idade	35g / 8(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo heterogênico / CD1
Nº de animais	20
Peso/Idade	35g / 8(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo heterogênico / CD1
Nº de animais	20
Peso/Idade	35g / 8(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo heterogênico / CD1
Nº de animais	20
Peso/Idade	35g / 8(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo heterogênico / CD1
Nº de animais	20
Peso/Idade	35g / 8(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da UFMG

*Espécie/linhagem	Camundongo heterogênico / CD1
Nº de animais	20
Peso/Idade	35g / 8(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo heterogênico / CD1
Nº de animais	20
Peso/Idade	35g / 8(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo heterogênico / CD1
Nº de animais	20
Peso/Idade	35g / 8(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo heterogênico / CD1
Nº de animais	20
Peso/Idade	35g / 8(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo heterogênico / CD1
Nº de animais	20
Peso/Idade	35g / 8(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da UFMG

Considerações posteriores:

08/02/2021	Aprovado na reunião on-line do dia 08/02/2021. Validade: 08/02/2021 à 07/02/2026
------------	---

Belo Horizonte, 13/04/2022.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto intitulado "Nanomateriais como carreadores de drogas neuroprotetoras na isquemia cerebral em camundongos", protocolo do CEUA: 88/2024 sob a responsabilidade de Andre Ricardo Massensini que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 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 da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 21/05/2024.

Vigência da Autorização	21/05/2024 a 20/05/2029
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/linhagem	Camundongo heterogênico / CD1
Nº de animais	20
Peso/Idade	35g / 8(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo heterogênico / CD1
Nº de animais	20
Peso/Idade	35g / 8(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo heterogênico / CD1
Nº de animais	20
Peso/Idade	35g / 8(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo heterogênico / CD1
Nº de animais	20
Peso/Idade	35g / 8(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo heterogênico / CD1
Nº de animais	20
Peso/Idade	35g / 8(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo heterogênico / CD1
Nº de animais	20
Peso/Idade	35g / 8(semanas)

Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo heterogênico / CD1
Nº de animais	20
Peso/Idade	35g / 8(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo heterogênico / CD1
Nº de animais	20
Peso/Idade	35g / 8(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo heterogênico / CD1
Nº de animais	20
Peso/Idade	35g / 8(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo heterogênico / CD1
Nº de animais	20
Peso/Idade	35g / 8(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo heterogênico / CD1
Nº de animais	20
Peso/Idade	35g / 8(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo heterogênico / CD1
Nº de animais	20
Peso/Idade	35g / 8(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo heterogênico / CD1
Nº de animais	20
Peso/Idade	35g / 8(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo heterogênico / CD1
Nº de animais	20
Peso/Idade	35g / 8(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo heterogênico / CD1
Nº de animais	20
Peso/Idade	35g / 8(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da UFMG

*Espécie/linhagem	Camundongo heterogênico / CD1
Nº de animais	20
Peso/Idade	35g / 8(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo heterogênico / CD1
Nº de animais	20
Peso/Idade	35g / 8(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo heterogênico / CD1
Nº de animais	20
Peso/Idade	35g / 8(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo heterogênico / CD1
Nº de animais	20
Peso/Idade	35g / 8(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo heterogênico / CD1
Nº de animais	20
Peso/Idade	35g / 8(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da UFMG

Dados dos animais agrupados (uso do biotério)	
*Espécie/linhagem	Camundongo heterogênico / CD1
Nº de animais	400
Idade	8(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da UFMG

Considerações posteriores:

21/05/2024	Aprovado no dia 21/05/2024. Validade: 21/05/2024 à 20/05/2029. Seu protocolo foi aprovado condicionado a resposta à diligência na reunião de 20/05/2024.
------------	--

Belo Horizonte, 23/05/2024.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005

31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br

10 ANEXO 3: Estudo da segurança de nanotubos de carbono em cultura celular

ANÁLISE DA SEGURANÇA DE NANOTUBOS DE CARBONO FUNCIONALIZADOS COM GT6 EM CULTURA CELULAR PRIMÁRIA DE NEURÔNIOS

O projeto de doutorado inicial era desenvolver nanoplataformas a partir de nanomateriais com o objetivo de compreender melhor suas ações frente a sistemas biológicos. As nanopartículas de ouro foram escolhidas como agentes neuroprotetores para a isquemia cerebral e nanocarreadores para passagem pela BHE e chegada no cérebro. Ao mesmo tempo, também desenvolvemos um projeto com nanotubos de carbono como biossensores para biomoléculas, no nosso caso, o neurotransmissor dopamina. Como os resultados das AuNPs se mostraram muito promissores e com o pouco tempo que tivemos para desenvolver os projetos por causa da pandemia, os resultados dos experimentos com o biossensor só atingiram seus estágios iniciais. Mesmo assim, achamos que seria muito interessante mostrar os resultados que conseguimos obter até o momento, sendo a razão pela qual decidimos escrever este anexo.

10.1 INTRODUÇÃO

Os nanomateriais, ao longo dos anos, tem demonstrado potenciais aplicações em diversas áreas. Desde seu uso na área da engenharia (BANIN et al., 2020; TLILI; ALKANHAL, 2019), até na área da tecnologia automobilística, alimentícia e têxtil (MALIK; MUHAMMAD; WAHEED, 2023; PRIMOŽIČ; KNEZ; LEITGEB, 2021, 2021). Por serem muito promissores, seus usos ramificaram-se para outras áreas, como a biomedicina, em que vêm sendo desenvolvidos fármacos, sensores e materiais biomédicos (MANN et al., 2022; ZHANG et al., 2020). Dentre os nanomateriais mais versáteis utilizados atualmente destacam-se os nanomateriais de carbono, por possuírem propriedades físicas e químicas únicas com possíveis aplicações em diversas áreas do conhecimento, como a eletrônica e o foco deste trabalho, a

biomédica (DAL BOSCO et al., 2015; MAHESWARAN; SHANMUGAVEL, 2022; PINALS et al., 2020). Dentre os materiais de carbono mais estudados e extensamente utilizados, destacam-se o fulereno, descoberto em 1985, por Kroto e colaboradores (KROTO et al., 1985), e dois outros alótropos do carbono: os nanotubos de carbono (CNT) descobertos em 1991 (IJIMA, 1991) e o grafeno em 2004 (NOVOSELOV et al., 2004). Por causa de suas promissoras aplicações e propriedades físico-químicas únicas, os CNT foram escolhidos para este trabalho.

10.1.1 *Nanotubos de carbono (CNT)*

Os CNTs são constituídos por estruturas cilíndricas formadas por folhas de grafeno enroladas em tubos de diâmetro nanométrico e comprimento na ordem de microns (DONALDSON et al., 2006). Eles foram descobertos por Iijima Sumio (IJIMA, 1991), que atualmente é professor na Universidade de Meijo, em Nagoya, e dirige o Centro de Pesquisa para Materiais de Carbono Avançados. Por esta descoberta, Iijima recebeu vários prêmios, dentre eles a medalha Benjamin Franklin em 2002 e o prêmio Kavli para nanociência em 2008.

Esse nanomaterial pode ser dividido em dois tipos: nanotubos de parede única ou simples (SWCNTs, do inglês single-wall carbon nanotubes), sendo constituídos por apenas uma camada cilíndrica do grafite (IJIMA, 1991), e os nanotubos de paredes múltiplas (MWCNTs, do inglês multi-wall carbon nanotubes) formados por vários cilindros concêntricos de grafite. Os diâmetros dessas nanoestruturas podem variar de 0,4 a 2 nm para os SWCNT (DRESSELHAUS; DRESSELHAUS; AVOURIS, 2001), foco

deste trabalho, e até 200 nm para os MWCNT, sendo que os comprimentos podem chegar a alguns milímetros (tipicamente até alguns micrômetros) (TRUONG et al., 2010). Esses materiais são fortes candidatos para aplicação na área biomédica, já que têm a capacidade de interagir com os sistemas biológicos em nível molecular e supramolecular com alto grau de especificidade (ACHARYA et al., 2024).

Uma de suas aplicações mais promissoras é a utilização como biossensores. Essa abordagem implica na detecção, quantificação e rastreamento de neurotransmissores, peptídeos e diversas moléculas biologicamente ativas dependentes de uma precisão temporal, espacial, além de alta seletividade e

sensibilidade. Atualmente, não há técnicas que englobem todas essas necessidades e implicações (KRUSS et al., 2017). A grande vantagem da utilização dos SWCNT como sensores em ambientes biológicos é sua capacidade de fluorescência no espectro de infravermelho próximo (NIR), resultado de diversas propriedades intrínsecas na sua fabricação (KRUSS et al., 2013). Esta propriedade permite uma janela de transparência óptica em tecidos biológicos, sendo possível enxergar os SWCNT, além de fotoestabilidade, ausência de fotobranqueamento e biocompatibilidade (O'CONNELL et al., 2002; RAVELLI et al., 2013).

Para se desenvolver um biossensor específico para um tipo de biomolécula, foi desenvolvida uma abordagem bastante interessante, a ligação de macromoléculas à superfície do SWCNT. Essa conjugação é chamada de CoPhMoRe (do inglês, corona phase molecular recognition), em que, por exemplo, sequências de oligonucleotídeos de DNA, como a sequência de fita simples ss(GT)₁₅ ou ss (GT)₆ (ss – do inglês, single stranded) são ligadas ao SWCNT e dão especificidade para diferentes analitos (BISKER; STRANO, 2017; STRANO, 2015). Portanto, essa plataforma CoPhMoRe poderia ser utilizada para desenvolver sensores para praticamente qualquer tipo de molécula.

Na literatura, há estudos que demonstram a sensorização das SWCNT em culturas celulares e *in vivo*. Kruss e colaboradores (2017) desenvolveram um sensor com fluorescência intrínseca no infravermelho próximo capaz de detectar a liberação de dopamina de células PC12 de modo espaço-temporal. Conjugando-se a sequência (GA)₁₅, eles obtiveram uma resolução espacial do nanosensor podendo assim observar as regiões de maior liberação de dopamina das células. Além disso, foi possível detectar que o efluxo de dopamina ocorria com mais frequência nas protuberâncias celulares, ajudando assim no maior entendimento da dinâmica de liberação da dopamina celular (KRUSS et al., 2017). Com o intuito de detectar a troponina, um biomarcador para infarto do miocárdio, Zhang e colaboradores (2014) desenvolveram uma nanoplataforma em que o SWCNT foi conjugada à quitosana. Neste estudo, foi possível desenvolver um biossensor rápido, direto e quantitativo, abrindo possibilidades para uma futura utilização na clínica médica (ZHANG et al., 2014a).

O uso dessas nanoplataformas é extremamente versátil, podendo ainda ser utilizados para imagem de cérebro profundo, registro de atividade neuronal, medição de morfologia cerebral e imagem de neuromodulação. Uma vez que já foram

observados avanços e resultados promissores, uma melhor compreensão desta dinâmica, principalmente quando o tecido cerebral está envolvido e conhecer seu impacto neste órgão é de suma importância. Com isto em mente, Yang e colaboradores (2020) estudaram o impacto de nanosensores de dopamina baseados em (GT)6-SWCNT em células microgliais SIM-A9 de camundongos e observaram a dinâmica de liberação de dopamina de fatias estriatais de camundongos machos C57/Bl6. Por meio de uma proposta de passivação, com foco no aumento da biocompatibilidade e a qualidade da imagem de dopamina, os autores peguilararam o nanomaterial (PEG-SWCNT) e mostraram mudanças morfológicas e transcriptômicas induzidas por SWCNT nessas células imunológicas do cérebro. Além disso, mostraram que fatias estriatais com nanosensores passivados exibem maior resposta de fluorescência à dopamina e medem mais locais putativos de liberação de dopamina (YANG et al., 2020).

Além da compreensão da dinâmica de liberação de dopamina por células neuronais, um tema que vem sendo muito discutido atualmente é a segurança e toxicidade destes nanomateriais frente aos sistemas biológicos. O potencial de toxicidade dos SWCNT é ditado por diversos fatores, como por exemplo, as propriedades morfológicas, como comprimento, funcionalização de superfície e estrutura eletrônica (CHETYRKINA; FEDOROV; NASIBULIN, 2022). Impressões digitais de toxicidade molecular específicas foram reveladas para SWCNTs com comprimentos variados, com o SWCNTs curtos exibindo um nível de toxicidade mais alto do que os longos, com a diminuição da viabilidade celular, o aumento do estresse oxidativo, inflamação e danos ao DNA. Em termos de propriedades de superfície, a funcionalização dos SWCNTs, nomeadamente carboxilação e hidroxilação, leva a uma toxicidade geral elevada, especialmente genotoxicidade, em comparação com os SWCNTs não modificados (JIANG et al., 2020). Devido a sua característica hidrofóbica, assim como estudado por Yang e colaboradores (2020) citados anteriormente, há a necessidade de passivação destes nanomateriais, como uma estratégia de diminuição do impacto (YANG et al., 2020). Neste contexto, Iverson e colaboradores (2013) desenvolveram uma nanoplataforma para detecção de óxido nítrico (NO) em um modelo de inflamação hepática em roedores. Eles observaram a necessidade de peguilação, uma vez que o biossensor se acumulava na veia da cauda dos animais quando injetados intravenosamente; agregação que foi resolvida com a passivação, demonstrando que a mudança na

superfície de SWCNT gera vantagens frente a sistemas biológicos, principalmente evitando interação com proteínas séricas, aumentando sua estabilidade (IVERSON et al., 2013).

Neste trabalho, foi escolhido estudar a segurança e toxicidade do (GT)6-SWCNT no SNC, uma abordagem ainda escassa na literatura. Esta escolha foi baseada nos estudos do grupo da pesquisadora Markita P.Landry, da Universidade da Califórnia, em Berkeley (BEYENE et al., 2019; YANG et al., 2020, 2022), em que a conjugação dos SWCNT com a sequência (GT)6 permite melhor interação com o SNC, com o aumento da biocompatibilidade e especificidade para detecção de dopamina.

10.2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

10.2.1 JUSTIFICATIVA

Os nanotubos de carbono de parede simples (SWCNT) têm demonstrado potencial significativo em diversas aplicações biomédicas, especialmente como biossensores para a detecção de neurotransmissores, como a dopamina. No entanto, a utilização desses nanomateriais em sistemas biológicos levanta preocupações sobre sua segurança e biocompatibilidade, uma vez que interações adversas com células e tecidos podem comprometer sua eficácia e causar efeitos colaterais indesejáveis. Este estudo visa preencher uma lacuna crítica no entendimento dos impactos dos SWCNT funcionalizados em células neuronais, fornecendo uma avaliação da toxicidade celular. Compreender esses aspectos é fundamental para o desenvolvimento seguro e eficaz de tecnologias baseadas em CNTs, garantindo que suas vantagens possam ser plenamente exploradas sem comprometer a saúde dos pacientes.

Além disso, a funcionalização dos SWCNT com macromoléculas específicas, como o DNA (GT)6, visa aumentar a especificidade e a sensibilidade dos biossensores, melhorando a detecção de dopamina. No entanto, essa modificação também pode alterar as propriedades físico-químicas dos nanotubos, influenciando

sua interação com os sistemas biológicos. Este estudo justifica-se pela necessidade de investigar como essas modificações afetam a toxicidade e a biocompatibilidade dos SWCNT em modelos de cultura celular primária de neurônios. Ao avaliar tanto a funcionalização quanto a toxicidade, os resultados deste trabalho contribuirão para a segurança e a eficiência das nanotecnologias na medicina, abrindo caminho para avanços inovadores no tratamento e diagnóstico de doenças neurológicas.

10.2.2 *Objetivo geral*

Avaliar a toxicidade dos (GT)6-SWCNT em um modelo de cultura celular primária de neurônios.

10.2.2.1 *Objetivos específicos*

- Funcionalizar e caracterizar os nanotubos de carbono com DNA (GT)6
- Avaliar a toxicidade os nanotubos de carbono com DNA (GT)6 em cultura primária cortical

10.3 MÉTODOS

10.3.1 *Funcionalização de SWCNTs com DNA*

Nanotubos de carbono de parede simples (SWCNTs) foram dispersos em solução aquosa utilizando DNA de fita simples (GT)6 combinando 1,7 mg de SWCNTs (CoMoCAT enriquecido em nanotubos (6,5)) (SweNT® SG65, #SG65-000-0035, SouthWest NanoTechnologies, EUA) e 1,7 mg de ssDNA (Exxtend Solução em Oligos, Brasil) em 2 mL de solução salina 0,1 M. A solução foi sonicada na ponta da sonda utilizando ultrassom (SONICS Vibra cell VCX 500) com uma ponta de 3 mm de diâmetro a uma potência de 5W, amplitude de 40%, durante 10 min em banho gelado. Após a sonicação, a solução foi incubada durante 30 min em temperatura ambiente. Posteriormente, foi centrifugada a 16.000G (Eppendorf 5415 R) por 90 min para separar os SWCNT não suspensos e carbono amorfo, separando também o sobrenadante contendo os (GT)6-SWCNTs dispersos para caracterização e uso (YANG et al., 2020) (Figura S1).

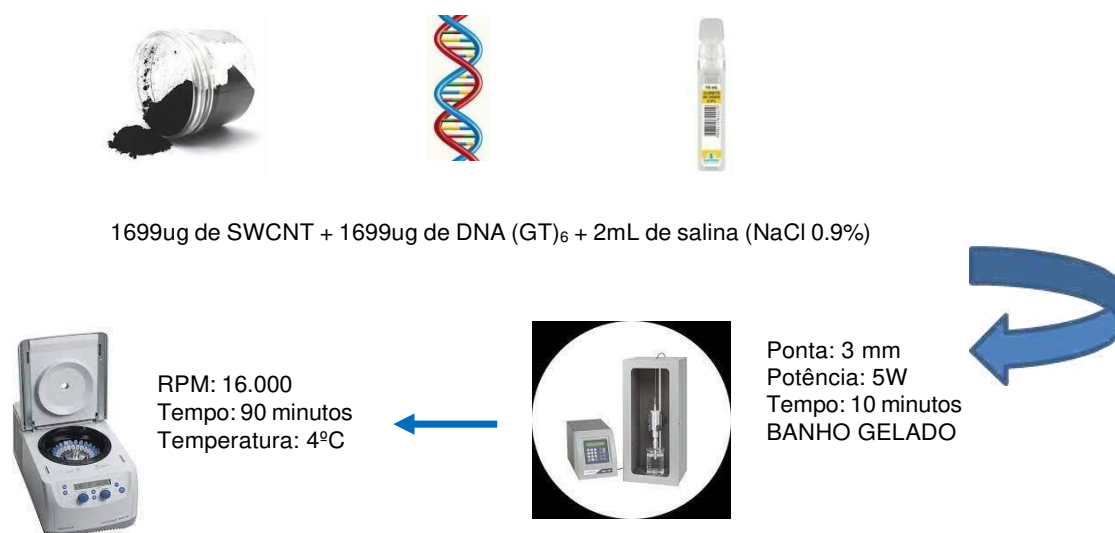


Figura S1: Rota de conjugação de SWCNT com DNA (GT)₆.

10.3.2 Caracterização do nanosensor

As amostras sintetizadas foram caracterizadas por espectroscopia de absorção óptica no UV-vis-NIR e de fluorescência. Após a exposição, o sensor foi analisado para observar a resposta de ativação por meio de alterações espectrais no sinal da fotoluminescência (intensidade e comprimento de onda da emissão) para a presença da molécula a ser detectada.

10.3.2.1 Espectroscopia de absorbância

O espectro de absorção óptica (AO) foi medido em um espectrofotômetro (Shimadzu UV3600) na região de 400 e 1300 nm (3,10 eV e 0,95 eV) para verificar a presença dos nanotubos (6,5) e sua reprodutibilidade. A amostra foi colocada em cubeta de quartzo (com 0,5 cm de caminho óptico) e uma solução salina 0,1 M foi utilizada como linha de base de referência. O espectro gerado foi plotado no software OriginPro[®] (versão 2022) para análises subsequentes. Para o tratamento dos espectros AO, as regiões de transição E11 e E22 foram separadas, e cada uma tratada separadamente. Uma linha de base linear foi tomada e as unidades de

comprimento de onda (nm) foram alteradas para unidades de energia (eV). Para o ajuste, cada pico foi tratado como uma Lorentziana, gerando assim, suas respectivas áreas (S).

10.3.2.2 *Concentração do nanosensor*

A concentração da suspensão de (GT)6-SWCNT foi determinada utilizando um cálculo a partir dos picos de absorção do espectro (GONTIJO et al., 2017). Os picos de absorção E11 e E22 foram relacionados com a absorbância medida por meio da lei de Beer-Lambert, obtendo-se uma equação que relaciona, para uma dada transição eletrônica da quiralidade, sua concentração $c(n,m)$ (mol/L) com a área de absorbância integrada $S(n,m)$ (eV), a força do oscilador f ($\times 0,001$) e o caminho óptico l (cm) (Schöppler et al., 2011)

$$c(n,m) = \alpha \frac{S(n,m)}{f \cdot l}$$

onde $\alpha = 3,48 \times 10^{-5}$ (mol x cm) / (eV x L). Posteriormente, a concentração molar c foi convertida para concentração comum C ($\frac{1}{2}$ g/mL), utilizando a massa atômica do carbono (12u).

10.3.2.3 *Espectroscopia de Fluorescência*

Um espectrômetro de fluorescência foi usado para coletar espectros de emissão na região do NIR (infravermelho próximo, do inglês: near- infrared) na região de 900- 1100 nm (5,6 eV e 6,8 eV). Este espectrômetro possui um laser de Ar-kr com excitação em 568,2nm, um espectrômetro Horiba T64000 com detector 1D-InGaAs (Horiba Symphony II). Foi utilizado também um espectrofluorímetro Horiba Fluorolog 3, para medidas de fotoluminescência de excitação (PLE). Os experimentos foram realizados em uma placa de 96 poços com 198 $\frac{1}{2}$ L da dispersão de (GT)6-SWCNT.

10.3.3 *Teste de toxicidade*

10.3.3.1 *Preparação de Culturas Primárias Neurais*

As culturas neuronais foram formadas a partir do córtex cerebral de embriões de camundongos C57BL/6 do tipo selvagem, no dia embrionário 15 (E15). Após a dissecação, o tecido cerebral foi submetido à digestão com tripsina, seguido pela dissociação celular usando uma pipeta Pasteur polida a fogo. As células neuronais foram cultivadas em placas revestidas com poli-L-ornitina em meio Neurobasal® suplementado com suplementos N2 e B27®, 2 mM GlutaMAX™, e penicilina e estreptomicina (50 µg/mL cada), e cultivadas in vitro por 5 dias a 37°C e 5% de CO₂ em uma incubadora umidificada (OLMO et al., 2017). Após este período, os meios foram trocados e 10.000 células foram plaqueadas em cada poço. Uma vez preparadas, as placas foram utilizadas para o teste de toxicidade.

10.3.3.2 *Toxicidade*

Uma curva de concentração foi gerada em que foram adicionados 90 µL de meio Neurobasal® (Gibco) e 10 µL de (GT)6-SWCNT a 3,3 µg/mL, 0,33 µg/mL e 0,033 µg/mL em triplicata, resultando, respectivamente, nas seguintes concentrações finais: 0,33 µg/mL, 0,033 µg/mL e 0,0033 µg/mL em cada poço, por períodos de 24h, 72h e 7 dias. Ao final de cada tempo, a viabilidade celular foi analisada pelo ensaio de Allamar Blue, um indicador sensível de oxidação-redução que apresenta fluorescência e muda de cor após redução por células vivas, mediada por enzimas mitocondriais (HAMID et al., 2004).

10.4 RESULTADOS

10.4.1 *Caracterização do nanosensor com (GT)6*

10.4.1.1 *Espectrofotometria de absorbância*

Foram observadas duas bandas de absorbância no espectro correspondentes às transições ópticas E11 e E22, que se referem, respectivamente, à primeira e à segunda transição entre as bandas de valência e de condução.

10.4.1.2 Concentração do nanosensor

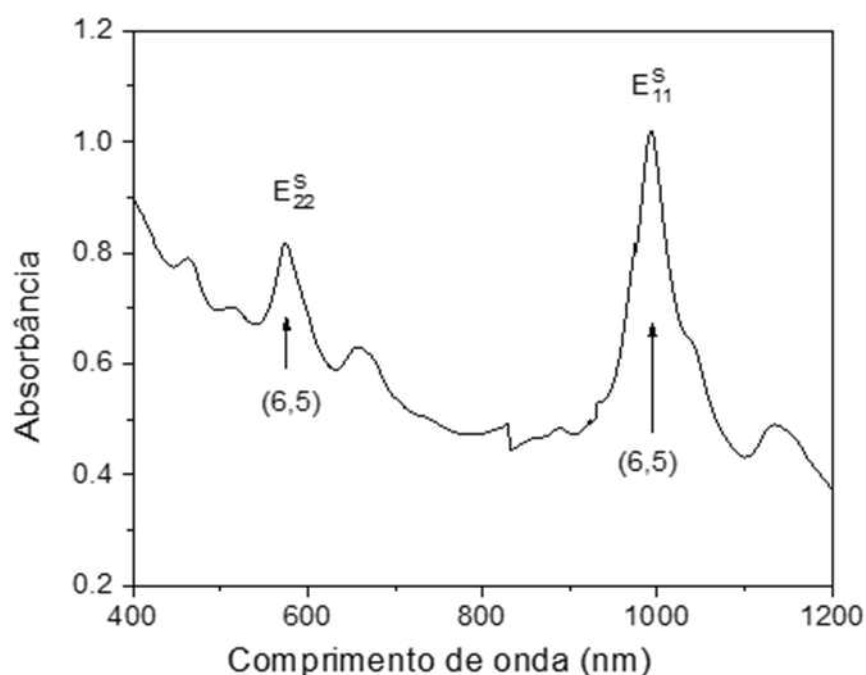


Figura S2. Espectro de absorção óptica dos nanotubos de carbono.

A partir dos espectros de absorbância foi calculada a concentração de (GT)6-SWCNT da amostra utilizando a equação abaixo.

$$c(n, m) = \propto \frac{S(n, m)}{f \cdot l}$$

Cálculo da concentração de SWCNT na amostra a partir do espectro de absorção óptica.

Equação obtida da lei de Beer-Lambert, onde $S(n, m)$ é a área integrada da absorbância, f é a força de oscilador e l é o caminho óptico percorrido. Os dados

foram retirados do trabalho de Gontijo e colaboradores (2017) e do gráfico de absorbância:

Dados:

$$\alpha = 3,48 \times 10^{-5} \text{ (mol} \times \text{cm)} / \text{(eV} \times \text{L)} \quad S(n,m) = 35 \times 10^{-3}$$

$$f_{11} = 10 \times (0,001) \quad f_{22} = 6.1$$

I

$$= 0,035$$

$$0 \quad C(n,m) = 3,48 \times 10^{-5}$$

,

$$5 \quad 0,01 \times 0,5$$

m

$$C(n,m) = 243,6 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$$

$$C(n,m) = 243,6 \times 10^{-5} \text{ mol/L} \times 12$$

$$C(n,m) = \bar{A}, 243,6 \mu\text{g/mL}$$

Para que o resultado fosse transformado em concentração comum, multiplicamos por 12 (MM do carbono), resultado em 3,28 µg/mL de nanotubo de carbono.

10.4.1.3 Espectroscopia de Fluorescência

A partir da análise do espectrômetro de fluorescência, é possível observar o valor máximo de excitação próximo de 578nm, constatando a presença dos SWCNT (6,5) na amostra.

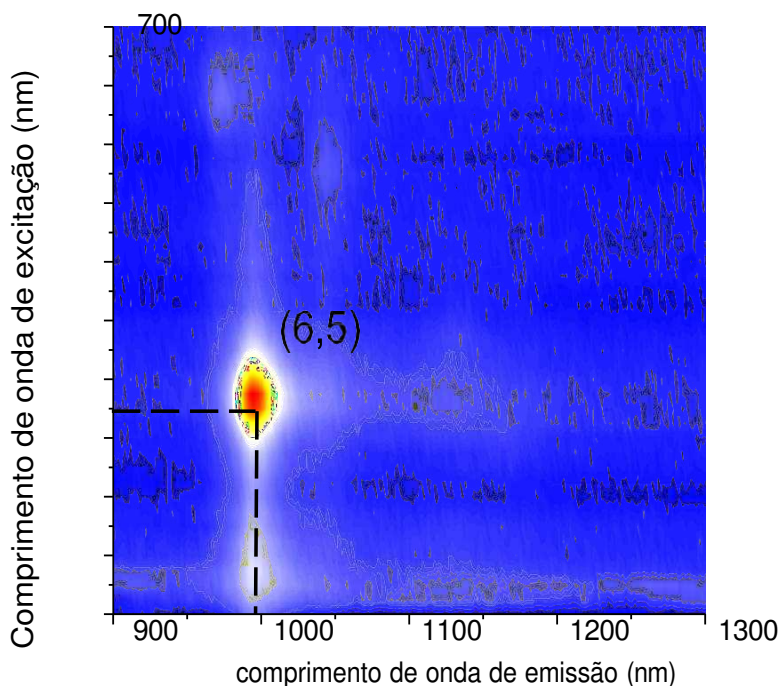


Figura S3. Intensidade da emissão por fotoluminescência dos SWCNTs para diferentes comprimentos de onda de excitação e emissão.

10.4.2 *Teste de toxicidade*

Para análise da toxicidade, uma cultura primária de neurônios corticais foi plaqueada com 10.000 células em cada poço. A viabilidade celular foi avaliada por Alamar Blue 24h, 72h e 7 dias após contato com o (GT)6-SWCNT. Na Figura S4, pode ser observado o gráfico em que no eixo x há os tempos de exposição da nanomaterial e no y a viabilidade celular em % em relação ao controle. As três concentrações do (GT)6-SWCNT foram analisadas e a partir dos resultados pode-se ver que nos dois primeiros tempos, não há diferença de viabilidade em nenhuma das concentrações em relação ao controle. Por outro lado, as duas menores concentrações (0,003 μ g/mL e 0,03 μ g/mL) apresentaram uma diferença estatística em relação ao controle, demonstrando aumento de viabilidade.

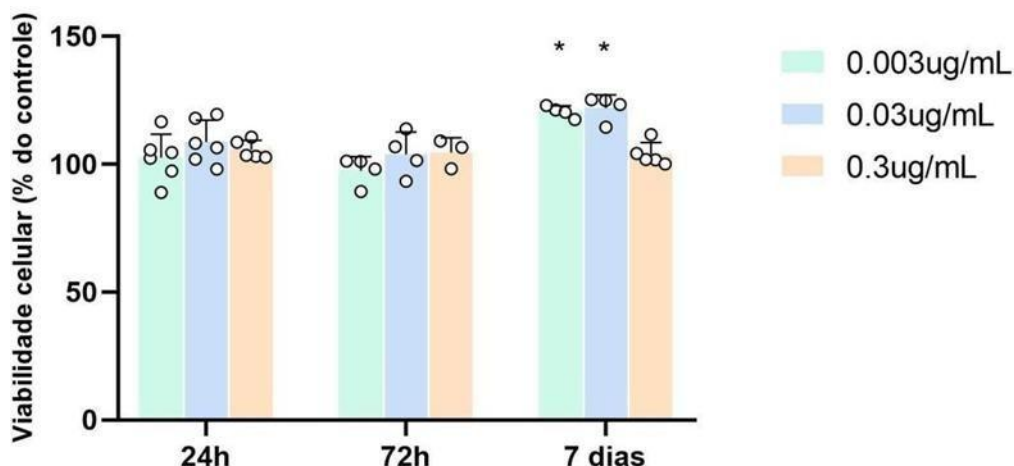


Figura S4. Análise da viabilidade celular em cultura primária de neurônios expostos ao (GT)6-SWCNT. O gráfico mostra no eixo nos tempos de 24h e 72h para uma análise aguda e 7 dias para uma análise crônica.

10.5 DISCUSSÃO

Os SWCNT (6,5) foram escolhidos por suas propriedades ópticas e sua facilitação na ligação a macromoléculas. A conjugação dos SWCNT com sequências de DNA facilita a penetração, gerando biocompatibilidade, e detecção de biomoléculas em culturas celulares e fatias cerebrais vivas, além de permitir a criação de um nanossensor mais específico para o tipo de molécula que se deseja estudar (KRUSS et al., 2013). No caso deste trabalho, o desenvolvimento de uma nanoplataforma para detecção de dopamina neuronal.

Yang e colaboradores (2020) utilizaram (GT)6-SWCNT para detecção de dopamina em fatias do estriado de camundongos e interações com as células imunológicas cerebrais, as micróglias (YANG et al., 2020). Neste trabalho, eles observaram que o biossensor foi capaz de detectar a dopamina, conseguindo identificar regiões de interesse e, ao mesmo tempo, alterações morfológicas e transcriptômicas nas micróglias. A partir destes dados, levantamos a questão da segurança e toxicidade desse biossensor e foi decidido avaliar seu impacto em células primárias neuronais corticais.

10.5.1 *Funcionalização e caracterização de nanotubos de carbono de parede simples (SWCNTs) com DNA*

A partir do protocolo de (YANG et al., 2020), os SWCNT foram conjugados com (GT)6. A escolha desta sequência de DNA se justifica por sua alta especificidade com a dopamina e melhor capacidade de detecção, diferente de outras sequências avaliadas em trabalhos anteriores (MANN et al., 2017). Uma vez produzido, foram realizados ensaios de caracterização para confirmação da presença dos SWCNT nas amostras e seu enriquecimento.

Na Figura S2, pode-se observar o gráfico de absorbância em que no eixo x se encontra os comprimentos de onda (nm), sendo a faixa do espectro eletromagnético, e no eixo y a absorbância em elétron-volts (eV). Na leitura de absorbância de SWCNT, há a presença de duas bandas principais, a E11 e E22. Essas bandas de absorção estão relacionadas às transições ópticas dos nanotubos referindo-se a intervalos de energia nos quais os nanotubos de carbono são capazes de absorver luz, desencadeando transições eletrônicas excitadas (GONTIJO et al., 2017). Geralmente, essas bandas de absorção ocorrem nas faixas do espectro eletromagnético conhecidas como visível (VIS) e infravermelho próximo (NIR).

É possível identificar as bandas E11 e E22, sendo que a banda E11 está associada à absorção de luz que induz a transição de um elétron de um estado fundamental para um estado mais excitado. A energia envolvida nessa transição depende da estrutura quiral do nanotubo, o que confere especificidade a cada tipo de nanotubo. Por outro lado, a banda E22 representa uma transição de energia mais elevada, localizada em uma região de energia superior à banda E11 (MANN et al., 2022). A partir dos picos de absorção mostrados no gráfico, pode-se inferir que a dispersão de SWCNT teve um alto rendimento, uma vez que apresentam picos altos, justificado pela alta absorbância e poucos agregados e maior dispersão, uma vez que os picos se mostram mais estreitos e menos alargados. Quanto maior a base do pico, maior agregação é inferida (YANG et al., 2013).

Para que o ensaio de toxicidade pudesse ser realizado, era importante saber a concentração de SWCNT presente na amostra. A partir dos cálculos desenvolvidos por Gontijo e colaboradores (2017) foi possível obter o valor de 3,28µg/mL. Este resultado leva em consideração os picos E11 e E22, analisados por absorbância e diversos fatores intrínsecos dos SWCNT e do material utilizado para análise. Este

dado corrobora com o resultado obtido por Yang e colaboradores (2017), em que foram encontrados 5µg/mL de SWCNT.

O ensaio de fluorescência foi realizado também com o objetivo de identificar a presença de SWCNT (6,5) na amostra. Neste ensaio, a amostra é excitada por uma lâmpada e fixada uma energia de excitação para obtenção de um espectro. Este processo é feito para várias energias de excitação, realizando assim uma varredura (ACKERMANN et al., 2022). A partir disso, ao atingir a excitação óptica, é obtido o valor máximo de excitação, o qual foi encontrado próximo de 578nm, como pode ser visto na Figura S3. Com este resultado, foi utilizado um laser próximo para realizar as medidas de fotoluminescência. Obtendo-se um espectro por vez, fixando o valor da energia de emissão e varrendo as energias de excitação, foi possível obter um pico, representado com cores quentes no gráfico (amarelo e vermelho) (SHIRAKI et al., 2020). Com este dado, foi possível inferir a presença e enriquecimento da amostra com os SWCNT (6,5).

10.5.2 Toxicidade

Uma vez realizada a caracterização, o próximo passo foi avaliar a toxicidade do (GT)6-SWCNT em uma cultura celular neuronal cortical. Como mostrado na Figura S4 nenhuma das concentrações escolhidas causou toxicidade, dado que pode ser observado pelo não aumento da viabilidade celular comparado ao grupo salina 100%. Mais especificamente, nas análises de 24h e 72h não foi observada diferença na viabilidade celular entre os grupos tratados com (GT)6-SWCNT e o grupo controle, demonstrando segurança do nanomaterial. Por outro lado, na análise de 7 dias, houve um aumento na viabilidade celular nos grupos menos concentrados de 0,003 µg/mL e 0,03 µg/mL ($p < 0,0009$ e $p < 0,007$, respectivamente).

Ainda não há estudos na literatura que avaliam a toxicidade do (GT)6-SWCNT em células neuronais corticais. Este dado é importante uma vez que esta conjugação traz mudanças físico-químicas para a nanoplateforma, mudando consequentemente sua interação com o sistema biológico. É sabido na literatura que diferentes tipos de SWCNT com diferentes tamanhos e grupos funcionais podem causar danos como genotoxicidade, estresse oxidativo, inflamação, danos ao DNA e apoptose (CHETYRKINA; FEDOROV; NASIBULIN, 2022) e que estas ações mudam dependendo da cultura celular ou órgão estudado.

Porém, essa realidade não é verdadeira para todos os casos. Outros fatores podem influenciar nas interações SWCNT x sistema biológico, como por exemplo, a

concentração utilizada nos ensaios. Analisando a frequência de distribuição para dose/tempo e viabilidade celular, foi possível observar na literatura que a maioria dos estudos usa valores de IC50 para suas análises toxicológicas e de acordo com os estudos, a dose de toxicidade IC50 dos nanotubos de carbono com melhor intervalo tóxico é de $< 10^{-5}$ g/mL para algumas linhas celulares após 24 horas de incubação, sendo os valores $4-5 \times 10^{-5}$ g/mL/h com melhores resultados (CHETYRKINA; FEDOROV; NASIBULIN, 2022). Isso quer dizer que a concentração obtida neste estudo está na faixa de segurança, sendo uma das explicações da não toxicidade do ensaio. Além disso, muitas outras interações podem ter interferido para este resultado. A composição do meio de cultura celular e a presença de proteína de soro bovino podem afetar fortemente a aglomeração de nanotubos, sua biodisponibilidade em dispersão e a internalização nas células (HANIU et al., 2013; ZHAO et al., 2015), gerando diversas discussões à cerca das interações SWCNT x células corticais.

É importante salientar que os dados apresentados neste anexo são preliminares e somente o começo dos estudos para melhor compreensão da relação (GT)6-SWCNT com a células neuronais. Mais estudos são necessários para melhor entendimento do aumento da viabilidade celular pelos grupos menos concentrados 7 dias após exposição e maior compreensão da dinâmica (GT)6-SWCNT x tecido cerebral, aprofundando os estudos em relação à morfologia celular, ao potencial de ação neuronal, à diferenciação celular e sua captação pelas células corticais.

10.6 CONCLUSÃO

Os dados obtidos neste estudo até o momento indicaram sucesso na conjugação da sequência de DNA (GT)6 nos SWCNT e que este biossensor não apresenta toxicidade em cultura celular primária cortical.

10.7 REFERÊNCIAS

ABBOTT, N. J.; RÖNNBÄCK, L.; HANSSON, E. Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 7, n. 1, p. 41–53, jan. 2006.

ACHAR, A.; MYERS, R.; GHOSH, C. Drug Delivery Challenges in Brain Disorders across the Blood–Brain Barrier: Novel Methods and Future Considerations for Improved Therapy. **Biomedicines**, v. 9, n. 12, p. 1834, dez. 2021.

ACHARYA, R. et al. Single-Walled Carbon Nanotube-Based Optical Nano/Biosensors for Biomedical Applications: Role in Bioimaging, Disease Diagnosis, and Biomarkers Detection. **Advanced Materials Technologies**, v. n/a, n. n/a, p. 2400279, [s.d.].

ACKERMANN, J. et al. Biosensing with Fluorescent Carbon Nanotubes. **Angewandte Chemie (International Ed. in English)**, v. 61, n. 18, p. e202112372, 25 abr. 2022.

AGGARWAL, P. et al. Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Identifying and Assessing Biomaterial Nanotoxicity in Translational Research for Preclinical Drug Development. v. 61, n. 6, p. 428–437, 21 jun. 2009.

AGRAWAL, M. et al. Recent advancements in the field of nanotechnology for the delivery of anti-Alzheimer drug in the brain region. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 15, n. 6, p. 589–617, 3 jun. 2018.

AHMADPOUR, N.; KANTROO, M.; STOBART, J. L. Extracellular Calcium Influx Pathways in Astrocyte Calcium Microdomain Physiology. **Biomolecules**, v. 11, n. 10, p. 1467, 6 out. 2021.

AHMED, S. et al. Biosynthesis of gold nanoparticles: A green approach. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 161, p. 141–153, 1 ago. 2016.

AKINTELU, S. A.; YAO, B.; FOLORUNSO, A. S. Bioremediation and pharmacological applications of gold nanoparticles synthesized from plant materials. **Heliyon**, v. 7, n. 3, p. e06591, mar. 2021.

AKSHAYA, K. et al. Bioconjugated gold nanoparticles as an efficient colorimetric sensor for cancer diagnostics. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 30, p. 101699, 1 jun. 2020.

ALBANESE, A.; TANG, P. S.; CHAN, W. C. W. The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 14, p. 1–16, 2012.

ALHADIDI, Q.; BIN SAYEED, M. S.; SHAH, Z. A. The Interplay between Cofilin and Phospho-Cofilin: Its Role in Maintaining Blood Brain Barrier Integrity. **CNS & neurological disorders drug targets**, v. 16, n. 3, p. 279–290, 2017.

ALI, S. A. et al. Pregabalin affords retinal neuroprotection in diabetic rats: Suppression of retinal glutamate, microglia cell expression and apoptotic cell death. **Experimental Eye Research**, v. 184, p. 78–90, jul. 2019.

ALJOHANI, F. S. et al. In vivo bio-distribution and acute toxicity evaluation of greenly synthesized ultra-small gold nanoparticles with different biological activities. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 6269, 15 abr. 2022.

ALKILANY, A. M.; MURPHY, C. J. Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: what we have learned so far? **Journal of Nanoparticle Research**, v. 12, n. 7, p. 2313–2333, set. 2010.

AMENDOLA, V. et al. Surface plasmon resonance in gold nanoparticles: a review. **Journal of Physics: Condensed Matter**, v. 29, n. 20, p. 203002, abr. 2017.

AMINA, S. J.; GUO, B. A Review on the Synthesis and Functionalization of Gold Nanoparticles as a Drug Delivery Vehicle. **International Journal of Nanomedicine**, 7 dez. 2020.

ANKARCRONA, M. et al. Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. **Neuron**, v. 15, n. 4, p. 961–973, out. 1995.

AOYAMA, K. Glutathione in the Brain. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 9, p. 5010, jan. 2021.

ARVIZO, R.; BHATTACHARYA, R.; MUKHERJEE, P. Gold nanoparticles: Opportunities and Challenges in Nanomedicine. **Expert opinion on drug delivery**, v. 7, n. 6, p. 753–763, jun. 2010.

AVERILL-BATES, D. A. Chapter Five - The antioxidant glutathione. Em: LITWACK, G. (Ed.). **Vitamins and Hormones**. Antioxidants. [s.l.] Academic Press, 2023. v. 121p. 109–141.

AVRUTSKY, M. I.; TROY, C. M. Caspase-9: A Multimodal Therapeutic Target With Diverse Cellular Expression in Human Disease. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, 9 jul. 2021.

AZAD, T. D. et al. Therapeutic strategies to improve drug delivery across the blood-brain barrier. **Neurosurgical Focus**, v. 38, n. 3, p. E9, mar. 2015.

BAHARARA, J. et al. Induction of Apoptosis by Green Synthesized Gold Nanoparticles Through Activation of Caspase-3 and 9 in Human Cervical Cancer Cells. **Avicenna Journal of Medical Biotechnology**, v. 8, n. 2, p. 75–83, 2016.

BANIN, U. et al. Nanotechnology for catalysis and solar energy conversion. **Nanotechnology**, v. 32, n. 4, p. 042003, nov. 2020.

BANKS, W. A. From blood–brain barrier to blood–brain interface: new opportunities for CNS drug delivery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 15, n. 4, p. 275–292, abr. 2016.

BARANI, M. et al. Recent Advances in Nanotechnology-Based Diagnosis and Treatments of Human Osteosarcoma. **Biosensors**, v. 11, n. 2, p. 55, fev. 2021.

BARRES, B. A. The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. **Neuron**, v. 60, n. 3, p. 430–440, 6 nov. 2008.

BAYDA, S. et al. The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical–Physical Applications to Nanomedicine. **Molecules**, v. 25, n. 1, p. 112, 27 dez. 2019.

BENVENISTE, H. et al. Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. **Journal of Neurochemistry**, v. 43, n. 5, p. 1369–1374, nov. 1984.

BERKER, K. I. et al. Modified Folin-Ciocalteu antioxidant capacity assay for measuring lipophilic antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 20, p. 4783–4791, 22 maio 2013.

BERNARDO-CASTRO, S. et al. Therapeutic Nanoparticles for the Different Phases of Ischemic Stroke. **Life**, v. 11, n. 6, p. 482, jun. 2021.

BERRIDGE, M. V.; SCHNEIDER, R. T.; MCCONNELL, M. J. Mitochondrial Transfer from Astrocytes to Neurons following Ischemic Insult: Guilt by Association? **Cell Metabolism**, v. 24, n. 3, p. 376–378, 13 set. 2016.

BEYENE, A. G. et al. Imaging striatal dopamine release using a nongenetically encoded near infrared fluorescent catecholamine nanosensor. **Science Advances**, v. 5, n. 7, p. eaaw3108, jul. 2019.

BIGHAM, N. P.; WILSON, J. J. Metal Coordination Complexes as Therapeutic Agents for Ischemia-Reperfusion Injury. **Journal of the American Chemical Society**, v. 145, n. 17, p. 9389–9409, 3 maio 2023.

BINDHU, M. R.; UMADEVI, M. Silver and gold nanoparticles for sensor and antibacterial applications. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 128, p. 37–45, 15 jul. 2014.

BISKER, G.; STRANO, M. S. (Invited) Synthetic Protein Recognition Using Fluorescent Single-Walled Carbon Nanotubes. **ECS Meeting Abstracts**, v. MA2017-01, n. 8, p. 636, 15 abr. 2017.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976a.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 7 maio 1976b.

BRUCH, G. E. et al. Liposomes for drug delivery in stroke. **Brain Research Bulletin**, v. 152, p. 246–256, 1 out. 2019.

BUNDGAARD, A. et al. Metabolic adaptations during extreme anoxia in the turtle heart and their implications for ischemia-reperfusion injury. **Scientific Reports**, v. 9, p. 2850, 26 fev. 2019.

BURSCH, W.; OBERHAMMER, F.; SCHULTE-HERMANN, R. Cell death by apoptosis and its protective role against disease. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 13, n. 6, p. 245–251, jun. 1992.

CAI, Z. et al. Role of Blood-Brain Barrier in Alzheimer's Disease. **Journal of Alzheimer's disease: JAD**, v. 63, n. 4, p. 1223–1234, 2018.

CARLANDER, D.; SKENTELBERY, C. EU Regulations and Nanotechnology Innovation. Em: LEAD, J. R.; DOAK, S. H.; CLIFT, M. J. D. (Eds.). **Nanotoxicology in Humans and the Environment**. Molecular and Integrative Toxicology. Cham: Springer International Publishing, 2021. p. 229–248.

CASALS, J. B. et al. The Use of Animal Models for Stroke Research: A Review. **Comparative Medicine**, v. 61, n. 4, p. 305–313, ago. 2011.

CASTELLANOS, M. et al. Inflammation-mediated damage in progressing lacunar infarctions: a potential therapeutic target. **Stroke**, v. 33, n. 4, p. 982–987, abr. 2002.

CASTILLO, J. et al. A novel mechanism of neuroprotection: Blood glutamate grabber. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 36, n. 2, p. 292–301, fev. 2016.

CEDERVALL, T. et al. Understanding the nanoparticle–protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 7, p. 2050–2055, 13 fev. 2007.

CHAI, F. et al. L-cysteine functionalized gold nanoparticles for the colorimetric detection of Hg²⁺ induced by ultraviolet light. **Nanotechnology**, v. 21, n. 2, p. 025501, 15 jan. 2010a.

CHAI, F. et al. Colorimetric Detection of Pb²⁺ Using Glutathione Functionalized Gold Nanoparticles. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 2, n. 5, p. 1466–1470, 26 maio 2010b.

CHAMORRO, Á. et al. Neuroprotection in acute stroke: targeting excitotoxicity, oxidative and nitrosative stress, and inflammation. **The Lancet. Neurology**, v. 15, n. 8, p. 869–881, jul. 2016.

CHANDRAKALA, V.; ARUNA, V.; ANGAJALA, G. Review on metal nanoparticles as nanocarriers: current challenges and perspectives in drug delivery systems. **Emergent Materials**, v. 5, n. 6, p. 1593–1615, 1 dez. 2022.

CHEN, C. et al. Insights into the Authentic Active Ingredients and Action Sites of Oral Exogenous Glutathione in the Treatment of Ischemic Brain Injury Based on Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Studies. **Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals**, v. 48, n. 1, p. 52–62, jan. 2020.

CHEN, L.; GAO, X. The application of nanoparticles for neuroprotection in acute ischemic stroke. **Therapeutic Delivery**, v. 8, n. 10, p. 915–928, out. 2017.

CHETYRKINA, M. R.; FEDOROV, F. S.; NASIBULIN, A. G. In vitro toxicity of carbon nanotubes: a systematic review. **RSC Advances**, v. 12, n. 25, p. 16235–16256, 23 maio 2022.

COMMANDEUR, J. N.; STIJNTJES, G. J.; VERMEULEN, N. P. Enzymes and transport systems involved in the formation and disposition of glutathione S-conjugates. Role in bioactivation and detoxication mechanisms of xenobiotics. **Pharmacological Reviews**, v. 47, n. 2, p. 271–330, jun. 1995.

CORREIA, A. C. et al. Lipid nanoparticles strategies to modify pharmacokinetics of central nervous system targeting drugs: Crossing or circumventing the blood–brain barrier (BBB) to manage neurological disorders. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 189, p. 114485, 1 out. 2022.

COUGHLIN, J. M. et al. A multimodal approach to studying the relationship between peripheral glutathione, brain glutamate, and cognition in health and in schizophrenia. **Molecular Psychiatry**, v. 26, n. 7, p. 3502–3511, jul. 2021.

CREIGHTON, J. A.; EADON, D. G. Ultraviolet–visible absorption spectra of the colloidal metallic elements. **Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions**, v. 87, n. 24, p. 3881–3891, 1 jan. 1991.

DA SILVA, A. R. et al. Alamandine abrogates neutrophil degranulation in atherosclerotic mice. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 47, n. 2, p. 117–128, fev. 2017.

DAEMS, N. et al. In Vivo Pharmacokinetics, Biodistribution and Toxicity of Antibody-Conjugated Gold Nanoparticles in Healthy Mice. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 16, n. 6, p. 985–996, 1 jun. 2020.

DAL BOSCO, L. et al. PEGylated carbon nanotubes impair retrieval of contextual fear memory and alter oxidative stress parameters in the rat hippocampus. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 104135, 2015.

DANEMAN, R.; PRAT, A. The blood-brain barrier. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 7, n. 1, p. a020412, 5 jan. 2015.

DARAEI, H. et al. Application of gold nanoparticles in biomedical and drug delivery. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 44, n. 1, p. 410–422, 2016.

DATTA, A. et al. Cell Death Pathways in Ischemic Stroke and Targeted Pharmacotherapy. **Translational Stroke Research**, v. 11, n. 6, p. 1185–1202, 1 dez. 2020.

DÁVALOS, A. et al. Duration of glutamate release after acute ischemic stroke. **Stroke**, v. 28, n. 4, p. 708–710, abr. 1997.

DE JONG, W. H. et al. Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration. **Biomaterials**, v. 29, n. 12, p. 1912–1919, 1 abr. 2008.

DEB, P.; SHARMA, S.; HASSAN, K. M. Pathophysiologic mechanisms of acute ischemic stroke: An overview with emphasis on therapeutic significance beyond thrombolysis. **Pathophysiology: The Official Journal of the International Society for Pathophysiology**, v. 17, n. 3, p. 197–218, jun. 2010.

DESSI, F. et al. Glutamate-Induced Neuronal Death Is Not a Programmed Cell Death in Cerebellar Culture. **Journal of Neurochemistry**, v. 60, n. 5, p. 1953–1955, 1993.

DHEYAB, M. A. et al. Gold nanoparticles-based photothermal therapy for breast cancer. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 42, p. 103312, 1 jun. 2023.

DHEYAB, M. A. et al. Gold nanoparticles-based photothermal therapy for breast cancer. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 42, p. 103312, 1 jun. 2023.

DIKSHIT, P. K. et al. Green Synthesis of Metallic Nanoparticles: Applications and Limitations. **Catalysts**, v. 11, n. 8, p. 902, ago. 2021.

DIRNAGL, U.; IADECOLA, C.; MOSKOWITZ, M. A. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. **Trends in Neurosciences**, v. 22, n. 9, p. 391–397, set. 1999.

DONALDSON, K. et al. Carbon Nanotubes: A Review of Their Properties in Relation to Pulmonary Toxicology and Workplace Safety. **Toxicological Sciences**, v. 92, n. 1, p. 5–22, 1 jul. 2006.

DONG, J. et al. Synthesis of Precision Gold Nanoparticles Using Turkevich Method. **Kona: powder science and technology in Japan**, v. 37, p. 224–232, 10 jan. 2020a.

DONG, W. et al. TRIM3 attenuates apoptosis in Parkinson's disease via activating PI3K/AKT signal pathway. **Aging (Albany NY)**, v. 13, n. 1, p. 735–749, 30 nov. 2020b.

DONG, X. Current Strategies for Brain Drug Delivery. **Theranostics**, v. 8, n. 6, p. 1481–1493, 2018.

DRIDI, N. et al. Probing Protein Corona Formation around Gold Nanoparticles: Effects of Surface Coating. **ACS Nano**, v. 18, n. 12, p. 8649–8662, 26 mar. 2024.

DU, B. et al. Glomerular barrier behaves as an atomically precise bandpass filter in a sub- nanometre regime. **Nature Nanotechnology**, v. 12, n. 11, p. 1096–1102, nov. 2017.

DZIEDZIC, T. Systemic inflammation as a therapeutic target in acute ischemic stroke. **Expert Review of Neurotherapeutics**, v. 15, n. 5, p. 523–531, maio 2015.

EL ASSAR, M.; ANGULO, J.; RODRÍGUEZ-MAÑAS, L. Oxidative stress and vascular inflammation in aging. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 65, p. 380–401, dez. 2013.

ELAHI, N.; KAMALI, M.; BAGHERSAD, M. H. Recent biomedical applications of gold nanoparticles: A review. **Talanta**, v. 184, p. 537–556, 1 jul. 2018.

EL-SAYED, Y.; YOUSSEF, E.; SHALABY, T. Effect of gold nanoparticles on cerebral damage in rat model of ischemia reperfusion injury. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 19, n. 1, p. 182–193, 1 jan. 2023.

ELTZSCHIG, H. K.; ECKLE, T. Ischemia and reperfusion—from mechanism to translation. **Nature Medicine**, v. 17, n. 11, p. 1391–1401, 7 nov. 2011.

FAN, J.; CHENG, Y.; SUN, M. Functionalized Gold Nanoparticles: Synthesis, Properties and Biomedical Applications. **The Chemical Record**, v. 20, n. 12, p. 1474–1504, 2020.

FARKOUH, A. et al. Sex-Related Differences in Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Frequently Prescribed Drugs: A Review of the Literature. **Advances in Therapy**, v. 37, n. 2, p. 644–655, 1 fev. 2020.

FERREIRA, J. P. et al. Gold Nanoparticles Improve Clinical Parameters and Reduce Neurological Alterations in Sepsis-Induced Mice. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 19, n. 1, p. 182–193, 1 jan. 2023.

FERRIGNO, A. et al. Selective Blockade of the Metabotropic Glutamate Receptor mGluR5 Protects Mouse Livers in In Vitro and Ex Vivo Models of Ischemia Reperfusion Injury. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 2, p. 314, 23 jan. 2018.

FEYNMAN, R. P. There's Plenty of Room at the Bottom. **Engineering and Science**, v. 23, n. 5, p. 22–36, 1 fev. 1960.

FURUKAWA, K. et al. The actin-severing protein gelsolin modulates calcium channel and NMDA receptor activities and vulnerability to excitotoxicity in hippocampal neurons. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 17, n. 21, p. 8178–8186, 1 nov. 1997.

GARCIA-ETXARRI, A.; YUSTE, R. Time for NanoNeuro. **Nature Methods**, v. 18, n. 11, p. 1287–1293, nov. 2021.

GHAZY, E. et al. Nanomaterials for Parkinson disease: Recent progress. **Journal of Molecular Structure**, v. 1231, p. 129698, 5 maio 2021.

GINER-CASARES, J. J. et al. Inorganic nanoparticles for biomedicine: where materials scientists meet medical research. **Materials Today**, v. 19, n. 1, p. 19–28, 1 jan. 2016.

GONÇALVES, S. C. A. et al. Alamandine Induces Neuroprotection in Ischemic Stroke Models. **Current Medicinal Chemistry**, v. 29, n. 19, p. 3483–3498, 1 jun. 2022.

GONG, Z. et al. Mechanisms of immune response and cell death in ischemic stroke and their regulation by natural compounds. **Frontiers in Immunology**, v. 14, 11 jan. 2024.

GONTIJO, R. N. et al. Quantifying (n,m) species in single-wall carbon nanotubes dispersions by combining Raman and optical absorption spectroscopies. **Carbon**, v. 115, p. 681–687, 1 maio 2017.

GRASSO, G.; ZANE, D.; DRAGONE, R. Microbial Nanotechnology: Challenges and Prospects for Green Biocatalytic Synthesis of Nanoscale Materials for Sensoristic and Biomedical Applications. **Nanomaterials**, v. 10, n. 1, p. 11, jan. 2020.

GROMNICOVA, R. et al. Glucose-coated gold nanoparticles transfer across human brain endothelium and enter astrocytes in vitro. **PloS One**, v. 8, n. 12, p. e81043, 2013.

GROTTA, J. C.; HELGASON, C. Ischemic stroke pathophysiology. **Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases: The Official Journal of National Stroke Association**, v. 8, n. 3, p. 114–116, 1999.

GUPTA, V. et al. Nanotechnology in Cosmetics and Cosmeceuticals—A Review of Latest Advancements. **Gels**, v. 8, n. 3, p. 173, mar. 2022.

HAMID, R. et al. Comparison of alamar blue and MTT assays for high through-put screening. **Toxicology in Vitro**, v. 18, n. 5, p. 703–710, 1 out. 2004.

HANIU, H. et al. Culture medium type affects endocytosis of multi-walled carbon nanotubes in BEAS-2B cells and subsequent biological response. **Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA**, v. 27, n. 6, p. 1679–1685, set. 2013.

HANKEY, G. J. Stroke. **Lancet (London, England)**, v. 389, n. 10069, p. 641–654, 11 fev. 2017.

HARATI, R. et al. Susceptibility of juvenile and adult blood-brain barrier to endothelin-1: regulation of P-glycoprotein and breast cancer resistance protein expression and transport activity. **Journal of Neuroinflammation**, v. 9, p. 273, 19 dez. 2012.

HARNOD, T.; LIN, C.-L.; KAO, C.-H. Risk of Suicide Attempt in Poststroke Patients: A Population- Based Cohort Study. **Journal of the American Heart Association**, v. 7, n. 2, p. e007830, 10 jan. 2018.

HARPER, B. et al. The Impact of Surface Ligands and Synthesis Method on the Toxicity of Glutathione-Coated Gold Nanoparticles. **Nanomaterials**, v. 4, n. 2, p. 355–371, jun. 2014.

HAWKINS, B. T.; DAVIS, T. P. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. **Pharmacological Reviews**, v. 57, n. 2, p. 173–185, jun. 2005.

HAYAKAWA, K. et al. Transfer of mitochondria from astrocytes to neurons after stroke. **Nature**, v. 535, n. 7613, p. 551–555, 27 jul. 2016.

HERSH, A. M.; ALOMARI, S.; TYLER, B. M. Crossing the Blood-Brain Barrier: Advances in Nanoparticle Technology for Drug Delivery in Neuro-Oncology. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 8, p. 4153, jan. 2022.

HIRN, S. et al. Particle size-dependent and surface charge-dependent biodistribution of gold nanoparticles after intravenous administration. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, Biological Barriers**, v. 77, n. 3, p. 407–416, 1 abr. 2011.

HOSSMANN, K. A. Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. **Annals of Neurology**, v. 36, n. 4, p. 557–565, out. 1994.

HUANG, H. et al. Gold Nanoparticles: Construction for Drug Delivery and Application in Cancer Immunotherapy. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 7, p. 1868, jul. 2023.

HUANG, X.; EL-SAYED, M. A. Gold nanoparticles: Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy. **Journal of Advanced Research**, v. 1, n. 1, p. 13–28, 1 jan. 2010.

HYEON, S. J. et al. Dysfunction of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) triggers neuropathological processes via altered p53 activity in Huntington's disease. **Progress in Neurobiology**, v. 204, p. 102110, 1 set. 2021.

IADECOLA, C. The Neurovascular Unit Coming of Age: A Journey through Neurovascular Coupling in Health and Disease. **Neuron**, v. 96, n. 1, p. 17–42, 27 set. 2017.

IJIMA, S. Helical microtubules of graphitic carbon. **Nature**, v. 354, n. 6348, p. 56–58, nov. 1991.

IRVIN-CHOY, N. S. et al. Gold nanoparticle biodistribution in pregnant mice following intravenous administration varies with gestational age. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 36, p. 102412, 1 ago. 2021.

ISKUSNYKH, I. Y.; ZAKHAROVA, A. A.; PATHAK, D. Glutathione in Brain Disorders and Aging. **Molecules**, v. 27, n. 1, p. 324, jan. 2022.

ISLAM, N. U. et al. Green synthesis and biological activities of gold nanoparticles functionalized with *Salix alba*. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 12, n. 8, p. 2914–2925, 1 dez. 2019.

IVERSON, N. M. et al. In Vivo Biosensing Via Tissue Localizable Near Infrared Fluorescent Single Walled Carbon Nanotubes. **Nature nanotechnology**, v. 8, n. 11, p. 873–880, nov. 2013.

JABIR, M. et al. Linalool-Loaded Glutathione-Modified Gold Nanoparticles Conjugated with CALNN Peptide as Apoptosis Inducer and NF- κ B Translocation

Inhibitor in SKOV-3 Cell Line. **International Journal of Nanomedicine**, v. 15, p. 9025–9047, 17 nov. 2020.

JANG, G. J. et al. Size Dependence Unveiling the Adsorption Interaction of High-Density Lipoprotein Particles with PEGylated Gold Nanoparticles in Biomolecular Corona Formation. **Langmuir**, v. 37, n. 32, p. 9755–9763, 17 ago. 2021.

JIA, Y.-P. et al. The in vitro and in vivo toxicity of gold nanoparticles. **Chinese Chemical Letters**, v. 28, n. 4, p. 691–702, 1 abr. 2017.

JIANG, T. et al. Toxicity of single-walled carbon nanotubes (SWCNTs): effect of lengths, functional groups and electronic structures revealed by a quantitative toxicogenomics assay. **Environmental Science: Nano**, v. 7, n. 5, p. 1348–1364, 22 maio 2020.

JIANG, X. et al. Blood-brain barrier dysfunction and recovery after ischemic stroke. **Progress in Neurobiology**, v. 163–164, p. 144–171, 2018.

JIN, X.-X. et al. Elevated lactate dehydrogenase predicts poor prognosis of acute ischemic stroke. **PLOS ONE**, v. 17, n. 10, p. e0275651, 7 out. 2022.

JINGYUE, Z.; BERND, F. Synthesis of gold nanoparticles via chemical reduction methods. **[S. L.]**, 2015.

KATSURA, K.; KRISTIÁN, T.; SIESJÖ, B. K. Energy metabolism, ion homeostasis, and cell damage in the brain. **Biochemical Society Transactions**, v. 22, n. 4, p. 991–996, nov. 1994.

KE, Y. et al. Photosynthesized gold nanoparticles from *Catharanthus roseus* induces caspase- mediated apoptosis in cervical cancer cells (HeLa). **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 47, n. 1, p. 1938–1946, 4 dez. 2019.

KEANEY, J.; CAMPBELL, M. The dynamic blood-brain barrier. **The FEBS journal**, v. 282, n. 21, p. 4067–4079, nov. 2015.

KERR, J. F.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**, v. 26, n. 4, p. 239–257, ago. 1972.

KHATRI, D. K. et al. Nanotechnological Advances for Nose to Brain Delivery of Therapeutics to Improve the Parkinson Therapy. **Current Neuropharmacology**, v. 21, n. 3, p. 493–516, 8 mar. 2023.

KIM, S. et al. Intercellular Bioimaging and Biodistribution of Gold Nanoparticle-Loaded Macrophages for Targeted Drug Delivery. **Electronics**, v. 9, n. 7, p. 1105, jul. 2020.

KINDY, M. S.; BHAT, A. N.; BHAT, N. R. Transient ischemia stimulates glial fibrillary acid protein and vimentin gene expression in the gerbil neocortex, striatum and hippocampus. **Molecular Brain Research**, v. 13, n. 3, p. 199–206, 1 abr. 1992.

KNITTEL, L. L. et al. Ultrasmall Gold Nanoparticles Coated with Zwitterionic Glutathione Monoethyl Ester: A Model Platform for the Incorporation of Functional Peptides. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 124, n. 19, p. 3892–3902, 14 maio 2020.

KORKMAZ, A. et al. Exposure Time Related Oxidative Action of Hyperbaric Oxygen in Rat Brain. **Neurochemical Research**, v. 33, n. 1, p. 160–166, 1 jan. 2008.

KOSTANDY, B. B. The role of glutamate in neuronal ischemic injury: the role of spark in fire. **Neurological Sciences: Official Journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology**, v. 33, n. 2, p. 223–237, abr. 2012.

KOUSHKI, E. Effect of conjugation with organic molecules on the surface plasmon resonance of gold nanoparticles and application in optical biosensing. **RSC Advances**, v. 11, n. 38, p. 23390–23399, 2021.

KOZICS, K. et al. Pharmacokinetics, Biodistribution, and Biosafety of PEGylated Gold Nanoparticles In Vivo. **Nanomaterials**, v. 11, n. 7, p. 1702, jul. 2021.

KREIBIG, U.; FRAGSTEIN, C. V. The limitation of electron mean free path in small silver particles. **Zeitschrift für Physik**, v. 224, n. 4, p. 307–323, 1 ago. 1969.

KROTO, H. W. et al. C60: Buckminsterfullerene. **Nature**, v. 318, n. 6042, p. 162–163, nov. 1985.

KRUSS, S. et al. Carbon nanotubes as optical biomedical sensors. **Advanced Drug Delivery Reviews, Carbon Nanotubes in Medicine and Biology: Therapy and Diagnostics & Safety and Toxicology**, v. 65, n. 15, p. 1933–1950, 1 dez. 2013.

KRUSS, S. et al. High-resolution imaging of cellular dopamine efflux using a fluorescent nanosensor array. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 8, p. 1789–1794, 21 fev. 2017.

KUMAR, M. et al. Nanoparticle biodistribution coefficients: A quantitative approach for understanding the tissue distribution of nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 194, p. 114708, 1 mar. 2023a.

KUMAR, M. et al. Nanoparticle biodistribution coefficients: A quantitative approach for understanding the tissue distribution of nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 194, p. 114708, 1 mar. 2023b.

KUPPUSAMY, P. et al. Biosynthesis of metallic nanoparticles using plant derivatives and their new avenues in pharmacological applications – An updated report. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 24, n. 4, p. 473–484, 1 jul. 2016.

KYLE, S.; SAHA, S. Nanotechnology for the detection and therapy of stroke. **Advanced Healthcare Materials**, v. 3, n. 11, p. 1703–1720, nov. 2014.

LANGEN, U. H.; AYLOO, S.; GU, C. Development and Cell Biology of the Blood-Brain Barrier. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 35, p. 591–613, 6 out. 2019.

LAURENT, G. et al. Characterization and biodistribution of Au nanoparticles loaded in PLGA nanocarriers using an original encapsulation process. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 205, p. 111875, 1 set. 2021.

LEE, K. X. et al. Recent Developments in the Facile Bio-Synthesis of Gold Nanoparticles (AuNPs) and Their Biomedical Applications. **International Journal of Nanomedicine**, v. 15, p. 275–300, 2020.

LEITE, H. R. et al. Swim training attenuates oxidative damage and promotes neuroprotection in cerebral cortical slices submitted to oxygen glucose deprivation. **Journal of Neurochemistry**, v. 123, n. 2, p. 317–324, out. 2012.

LESZEK, J. et al. Nanotechnology for Alzheimer Disease. **Current Alzheimer Research**, v. 14, n. 11, p. 1182–1189, 1 nov. 2017.

LI, J. et al. Highly sensitive and selective colorimetric and SERS dual-mode detection of arsenic (III) based on glutathione functionalized gold nanoparticles. **Sensors and Actuators Reports**, v. 2, n. 1, p. 100013, 1 nov. 2020a.

LI, L. et al. Oridonin ameliorates caspase-9-mediated brain neuronal apoptosis in mouse with ischemic stroke by inhibiting RIPK3-mediated mitophagy. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 44, n. 4, p. 726–740, abr. 2023.

LI, R. et al. Green synthesis of gold nanoparticles from the extract of *Crocus sativus* to study the effect of antidepressant in adolescence and to observe its aggressive and impulsive behavior in rat models. **South African Journal of Botany**, v. 165, p. 455–465, 1 fev. 2024.

LI, S.-D.; HUANG, L. Stealth Nanoparticles: High Density but Sheddable PEG is a Key for Tumor Targeting. **Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society**, v. 145, n. 3, p. 178–181, 3 ago. 2010.

LI, X. et al. The systematic evaluation of size-dependent toxicity and multi-time biodistribution of gold nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 167, p. 260–266, 1 jul. 2018.

LI, X. et al. Surface chemistry governs the sub-organ transfer, clearance and toxicity of functional gold nanoparticles in the liver and kidney. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 18, n. 1, p. 45, 14 mar. 2020b.

LI, X. et al. Cerium oxide nanoparticles with antioxidative neurorestoration for ischemic stroke. **Biomaterials**, v. 291, p. 121904, dez. 2022.

LI, Z. et al. A preparation of *Ginkgo biloba* L. leaves extract inhibits the apoptosis of hippocampal neurons in post-stroke mice via regulating the expression of Bax/Bcl-2 and Caspase-3. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 280, p. 114481, 15 nov. 2021.

LIM, I.-I. S. et al. Interparticle Interactions in Glutathione Mediated Assembly of Gold Nanoparticles. **Langmuir**, v. 24, n. 16, p. 8857–8863, 1 ago. 2008.

LINK, S.; EL-SAYED, M. A. Size and Temperature Dependence of the Plasmon Absorption of Colloidal Gold Nanoparticles. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 103, n. 21, p. 4212–4217, 1 maio 1999.

LIU, T. et al. Imbalanced GSH/ROS and sequential cell death. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 36, n. 1, p. e22942, jan. 2022.

LIU, X. et al. Surface and Size Effects on Cell Interaction of Gold Nanoparticles with Both Phagocytic and Nonphagocytic Cells. **Langmuir**, v. 29, n. 29, p. 9138–9148, 23 jul. 2013a.

LIU, X.-Y. et al. Gold nanoparticles: synthesis, physiochemical properties and therapeutic applications in cancer. **Drug Discovery Today**, v. 26, n. 5, p. 1284–1292, 1 maio 2021.

LIU, Z. et al. An intrinsic therapy of gold nanoparticles in focal cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 9, n. 6, p. 1017–1028, jun. 2013b.

LIU, Z. et al. Application of inductively coupled plasma mass spectrometry in the study of apoptosis: determination of caspase-3 using a gold nanoparticle tag. **Analyst**, v. 141, n. 3, p. 926–933, 25 jan. 2016.

LOPEZ-CHAVES, C. et al. Gold nanoparticles: Distribution, bioaccumulation and toxicity. In vitro and in vivo studies. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 14, n. 1, p. 1–12, jan. 2018.

LOSSI, L. The concept of intrinsic versus extrinsic apoptosis. **Biochemical Journal**, v. 479, n. 3, p. 357–384, 11 fev. 2022.

LOVE, S. Apoptosis and brain ischaemia. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 27, n. 2, p. 267–282, abr. 2003.

LUO, D. et al. Recent Development of Gold Nanoparticles as Contrast Agents for Cancer Diagnosis. **Cancers**, v. 13, n. 8, p. 1825, jan. 2021.

LV, W. et al. Bioengineered Boronic Ester Modified Dextran Polymer Nanoparticles as Reactive Oxygen Species Responsive Nanocarrier for Ischemic Stroke Treatment. **ACS Nano**, v. 12, n. 6, p. 5417–5426, 26 jun. 2018.

MA, Y.; HONG, J.; DING, Y. Biological Behavior Regulation of Gold Nanoparticles via the Protein Corona. **Advanced Healthcare Materials**, v. 9, n. 6, p. 1901448, 2020.

MAHESWARAN, R.; SHANMUGAVEL, B. P. A Critical Review of the Role of Carbon Nanotubes in the Progress of Next-Generation Electronic Applications. **Journal of Electronic Materials**, v. 51, n. 6, p. 2786–2800, 1 jun. 2022.

MALIK, S.; MUHAMMAD, K.; WAHEED, Y. Nanotechnology: A Revolution in Modern Industry. **Molecules**, v. 28, n. 2, p. 661, jan. 2023.

MANN, F. A. et al. Tuning Selectivity of Fluorescent Carbon Nanotube-Based Neurotransmitter Sensors. **Sensors**, v. 17, n. 7, p. 1521, jul. 2017.

MANN, F. A. et al. Quantum defects as versatile anchors for carbon nanotube functionalization. **Nature Protocols**, v. 17, n. 3, p. 727–747, mar. 2022.

MANZANERO, S.; SANTRO, T.; ARUMUGAM, T. V. Neuronal oxidative stress in acute ischemic stroke: sources and contribution to cell injury. **Neurochemistry International**, v. 62, n. 5, p. 712–718, abr. 2013.

MAO, R. et al. Neuronal Death Mechanisms and Therapeutic Strategy in Ischemic Stroke. **Neuroscience Bulletin**, v. 38, n. 10, p. 1229–1247, 1 out. 2022.

MAO, X.; LI, Z.-P.; TANG, Z.-Y. One pot synthesis of monodispersed L- glutathione stabilized gold nanoparticles for the detection of Pb²⁺ ions. **Frontiers of Materials Science**, v. 5, n. 3, p. 322–328, 1 set. 2011.

MARKERT, C. L. Lactate dehydrogenase. Biochemistry and function of lactate dehydrogenase. **Cell biochemistry and function**, v. 2, n. 3, p. 131–134, 1984a.

MARKERT, C. L. Lactate dehydrogenase. Biochemistry and function of lactate dehydrogenase. **Cell Biochemistry and Function**, v. 2, n. 3, p. 131–134, jul. 1984b.

MASSENSINI, A. R. et al. Alpha- and beta-scorpion toxins evoke glutamate release from rat cortical synaptosomes with different effects on [Na⁺]_i and [Ca²⁺]_i. **Neuropharmacology**, v. 37, n. 3, p. 289–297, 1998.

MAYER, S. A.; RINCON, F. Treatment of intracerebral haemorrhage. **The Lancet. Neurology**, v. 4, n. 10, p. 662–672, out. 2005.

MCCONNELL, H. L.; MISHRA, A. Cells of the Blood-brain Barrier: an Overview of the Neurovascular Unit in Health and Disease. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 2492, p. 3–24, 2022.

MIESZAWSKA, A. J. et al. Multifunctional Gold Nanoparticles for Diagnosis and Therapy of Disease. **Molecular Pharmaceutics**, v. 10, n. 3, p. 831–847, 4 mar. 2013.

MIKHED, Y.; DAIBER, A.; STEVEN, S. Mitochondrial Oxidative Stress, Mitochondrial DNA Damage and Their Role in Age-Related Vascular Dysfunction. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 7, p. 15918–15953, 13 jul. 2015.

MILAN, J.; NIEMCZYK, K.; KUS-LIŚKIEWICZ, M. Treasure on the Earth—Gold Nanoparticles and Their Biomedical Applications. **Materials**, v. 15, n. 9, p. 3355, 7 maio 2022.

MOSKOWITZ, M. A.; LO, E. H.; IADECOLA, C. The Science of Stroke: Mechanisms in Search of Treatments. **Neuron**, v. 67, n. 2, p. 181–198, 29 jul. 2010.

MOURÃO, F. A. G. et al. Neuroprotective effect of exercise in rat hippocampal slices submitted to in vitro ischemia is promoted by decrease of glutamate release and pro-apoptotic markers. **Journal of Neurochemistry**, v. 131, n. 1, p. 65–73, 2014.

MULLER, A. P. et al. Gold nanoparticles prevent cognitive deficits, oxidative stress and inflammation in a rat model of sporadic dementia of Alzheimer's type. **Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications**, v. 77, p. 476–483, 1 ago. 2017.

MÜNZEL, T. et al. Vascular consequences of endothelial nitric oxide synthase uncoupling for the activity and expression of the soluble guanylyl cyclase and the cGMP-dependent protein kinase. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 25, n. 8, p. 1551–1557, ago. 2005.

NARAYANAN, K. B.; SAKTHIVEL, N. Coriander leaf mediated biosynthesis of gold nanoparticles. **Materials Letters**, v. 62, n. 30, p. 4588–4590, 15 dez. 2008.

NAZARIAN, S. et al. Mesenchymal stem cells with modafinil (gold nanoparticles) significantly improves neurological deficits in rats after middle cerebral artery occlusion. **Experimental Brain Research**, v. 238, n. 11, p. 2589–2601, 1 nov. 2020.

NEJATI, K. et al. Biomedical Applications of Functionalized Gold Nanoparticles: A Review. **Journal of Cluster Science**, v. 33, n. 1, p. 1–16, 1 jan. 2022.

NGUYEN, T. H. A. et al. Novel biogenic silver and gold nanoparticles for multifunctional applications: Green synthesis, catalytic and antibacterial activity, and colorimetric detection of Fe(III) ions. **Chemosphere**, v. 287, p. 132271, 1 jan. 2022.

NICHOLLS, D. G.; SIHRA, T. S.; SANCHEZ-PRIETO, J. Calcium-Dependent and-Independent Release of Glutamate from Synaptosomes Monitored by Continuous Fluorometry. **Journal of Neurochemistry**, v. 49, n. 1, p. 50–57, 1 jul. 1987.

NICHOLSON, D. W.; THORNBERRY, N. A. Caspases: killer proteases. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 22, n. 8, p. 299–306, ago. 1997.

NOVOSELOV, K. S. et al. Electric Field Effect in Atomically Thin Carbon Films. **Science**, v. 306, n. 5696, p. 666–669, 22 out. 2004.

O'CONNELL, M. J. et al. Band Gap Fluorescence from Individual Single-Walled Carbon Nanotubes. **Science**, v. 297, n. 5581, p. 593–596, 26 jul. 2002.

OLMO, I. G. et al. Zika Virus Promotes Neuronal Cell Death in a Non-Cell Autonomous Manner by Triggering the Release of Neurotoxic Factors. **Frontiers in Immunology**, v. 8, 23 ago. 2017.

ORRENIUS, S.; ZHIVOTOVSKY, B.; NICOTERA, P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 4, n. 7, p. 552–565, jul. 2003.

OZCICEK, I. et al. The effects of surface functionality and size of gold nanoparticles on neuronal toxicity, apoptosis, ROS production and cellular/suborgan biodistribution. **Materials Science and Engineering: C**, v. 128, p. 112308, 1 set. 2021.

PANAHZADEH, F.; MIRNASURI, R.; RAHMATI, M. Exercise and Syzygium aromaticum reverse memory deficits, apoptosis and mitochondrial dysfunction of the hippocampus in Alzheimer's disease. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 286, p. 114871, 25 mar. 2022.

PEI, H. et al. An electrochemical chiral sensor based on glutamic acid functionalized graphene-gold nanocomposites for chiral recognition of tryptophan enantiomers. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 913, p. 116283, 15 maio 2022.

PELAZ, B. et al. Surface Functionalization of Nanoparticles with Polyethylene Glycol: Effects on Protein Adsorption and Cellular Uptake. **ACS Nano**, v. 9, n. 7, p. 6996–7008, 28 jul. 2015.

PEM, B. et al. Toxicity and safety study of silver and gold nanoparticles functionalized with cysteine and glutathione. **Beilstein Journal of Nanotechnology**, v. 10, n. 1, p. 1802–1817, 2 set. 2019.

PINALS, R. L. et al. Quantitative Protein Corona Composition and Dynamics on Carbon Nanotubes in Biological Environments. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 59, n. 52, p. 23668–23677, 2020.

POLTE, J. et al. Mechanism of gold nanoparticle formation in the classical citrate synthesis method derived from coupled in situ XANES and SAXS evaluation. **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, n. 4, p. 1296–1301, 3 fev. 2010.

POLTE, J. Fundamental growth principles of colloidal metal nanoparticles – a new perspective. **CrystEngComm**, v. 17, n. 36, p. 6809–6830, 1 set. 2015.

PONGSUCHART, M. et al. Effect of Glutathione-Stabilized Gold Nanoparticles in 3T3 Fibroblast Cell. [**S. L.**], 5 jan. 2012.

POWERS, W. J. et al. 2018 Guidelines for the Early Management of Patients With Acute Ischemic Stroke: A Guideline for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. **Stroke**, v. 49, n. 3, p. e46–e110, mar. 2018.

PRIMOŽIČ, M.; KNEZ, Ž.; LEITGEB, M. (Bio)Nanotechnology in Food Science—Food Packaging. **Nanomaterials**, v. 11, n. 2, p. 292, fev. 2021.

RADAK, D. et al. Apoptosis and Acute Brain Ischemia in Ischemic Stroke. **Current Vascular Pharmacology**, v. 15, n. 2, p. 115–122, 1 mar. 2017.

RAFII, M. S.; HILLIS, A. E. Compendium of cerebrovascular diseases. **International Review of Psychiatry (Abingdon, England)**, v. 18, n. 5, p. 395–407, out. 2006.

RAMPADO, R. et al. Recent Advances in Understanding the Protein Corona of Nanoparticles and in the Formulation of <Stealthy= Nanomaterials. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, 3 abr. 2020.

RATTAN, R. et al. A Mini-Review on Lichen-Based Nanoparticles and Their Applications as Antimicrobial Agents. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 633090, 12 mar. 2021.

RAVELLI, D. et al. PEGylated carbon nanotubes: preparation, properties and applications. **RSC Advances**, v. 3, n. 33, p. 13569–13582, 30 jul. 2013.

REESE, T. S.; KARNOVSKY, M. J. Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. **The Journal of Cell Biology**, v. 34, n. 1, p. 207–217, jul. 1967.

REQUEJO, K. I.; LIOPO, A. V.; ZUBAREV, E. R. Gold Nanorod Synthesis with Small Thiolated Molecules. **Langmuir**, v. 36, n. 14, p. 3758–3769, 14 abr. 2020.

RODRÍGUEZ-ARELLANO, J. J. et al. Astrocytes in physiological aging and Alzheimer's disease. **Neuroscience**, v. 323, p. 170–182, 26 maio 2016.

ROTHWELL, N. J.; HOPKINS, S. J. Cytokines and the nervous system II: Actions and mechanisms of action. **Trends in Neurosciences**, v. 18, n. 3, p. 130–136, mar. 1995.

ROTONDA, J. et al. The three-dimensional structure of apopain/CPP32, a key mediator of apoptosis. **Nature Structural Biology**, v. 3, n. 7, p. 619–625, jul. 1996.

SACCO, R. L. et al. Guidelines for prevention of stroke in patients with ischemic stroke or transient ischemic attack: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association Council on Stroke: co-sponsored by the Council on Cardiovascular Radiology and Intervention: the American Academy of Neurology affirms the value of this guideline. **Stroke**, v. 37, n. 2, p. 577–617, fev. 2006.

SANTHOSH, P. B.; GENOVA, J.; CHAMATI, H. Green Synthesis of Gold Nanoparticles: An Eco-Friendly Approach. **Chemistry**, v. 4, n. 2, p. 345–369, jun. 2022.

SARAIVA, C. et al. Nanoparticle-mediated brain drug delivery: Overcoming blood-brain barrier to treat neurodegenerative diseases. **Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society**, v. 235, p. 34–47, 10 ago. 2016.

SARFRAZ, N.; KHAN, I. Plasmonic Gold Nanoparticles (AuNPs): Properties, Synthesis and their Advanced Energy, Environmental and Biomedical Applications. **Chemistry – An Asian Journal**, v. 16, n. 7, p. 720–742, 2021.

SATAPATHY, M. K. et al. Solid Lipid Nanoparticles (SLNs): An Advanced Drug Delivery System Targeting Brain through BBB. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 8, p. 1183, ago. 2021.

SATHIYANARAYANAN, G. et al. Optimization of polyhydroxybutyrate production by marine *Bacillus megaterium* MSBN04 under solid state culture. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 60, p. 253–261, 1 set. 2013.

SELIM, M. E.; ABD-ELHAKIM, Y. M.; AL-AYADHI, L. Y. Pancreatic Response to Gold Nanoparticles Includes Decrease of Oxidative Stress and Inflammation In Autistic Diabetic Model. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 35, n. 2, p. 586–600, 27 jan. 2015.

SELIM, M.; HENDI, A. Gold Nanoparticles Induce Apoptosis in MCF-7 Human Breast Cancer Cells. **Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP**, v. 13, p. 1617–20, 30 abr. 2012.

SHAHEEN, T. I. Nanotechnology for modern textiles: highlights on smart applications. **The Journal of The Textile Institute**, v. 113, n. 10, p. 2274–2284, 26 set. 2022.

SHAJKUMAR, A. et al. Silica-supported Au@hollow-SiO₂ particles with outstanding catalytic activity prepared via block copolymer template approach. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 491, p. 246–254, 1 abr. 2017.

SHARIFI, M. et al. Plasmonic gold nanoparticles: Optical manipulation, imaging, drug delivery and therapy. **Journal of Controlled Release**, v. 311–312, p. 170–189, 1 out. 2019.

SHARIFI, M. et al. Application of thermal annealing-assisted gold nanoparticles for ultrasensitive diagnosis of pancreatic cancer using localized surface plasmon resonance. **Microchemical Journal**, v. 190, p. 108698, 1 jul. 2023.

SHARMA, D. et al. A Highly Sensitive Immunosensor Based on In Situ Reduced Gold-Chitosan Nanocomposite for Detection of Monosodium L-glutamate. **Journal of Biosystems Engineering**, v. 47, n. 1, p. 28–38, 1 mar. 2022.

SHARMA, N. et al. Exploitation of marine bacteria for production of gold nanoparticles. **Microbial Cell Factories**, v. 11, n. 1, p. 86, 20 jun. 2012.

SHENDE, P.; SARDESAI, M.; GAUD, R. S. Micro to nanoneedles: a trend of modernized transepidermal drug delivery system. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 46, n. 1, p. 19–25, 2 jan. 2018.

SHIRAKI, T. et al. Carbon Nanotube Photoluminescence Modulation by Local Chemical and Supramolecular Chemical Functionalization. **Accounts of Chemical Research**, v. 53, n. 9, p. 1846–1859, 15 set. 2020.

SIBUYI, N. R. S. et al. Multifunctional Gold Nanoparticles for Improved Diagnostic and Therapeutic Applications: A Review. **Nanoscale Research Letters**, v. 16, n. 1, p. 174, 5 dez. 2021.

SIMPSON, C. A. et al. In vivo toxicity, biodistribution, and clearance of glutathione-coated gold nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 9, n. 2, p. 257–263, 1 fev. 2013.

SINGH, A. K. et al. Green synthesis of gold nanoparticles from *Dunaliella salina*, its characterization and in vitro anticancer activity on breast cancer cell line. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 51, p. 164–176, 1 jun. 2019.

SINGH, S. et al. Focusing the pivotal role of nanotechnology in Huntington's disease: an insight into the recent advancements. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, n. 49, p. 73809–73827, 1 out. 2022.

SINISCALCHI, A. et al. Cerebral stroke injury: the role of cytokines and brain inflammation. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, v. 25, n. 2, p. 131–137, 1 maio 2014.

SODIPO, B. K.; MOHAMMED, Z. K. Advances in biodistribution of gold nanoparticles: the influence of size, surface charge, and route of administration. **Biomedical Materials**, v. 19, n. 4, p. 042010, jun. 2024.

SONAVANE, G.; TOMODA, K.; MAKINO, K. Biodistribution of colloidal gold nanoparticles after intravenous administration: Effect of particle size. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 66, n. 2, p. 274–280, 15 out. 2008a.

SONAVANE, G.; TOMODA, K.; MAKINO, K. Biodistribution of colloidal gold nanoparticles after intravenous administration: Effect of particle size. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 66, n. 2, p. 274–280, 15 out. 2008b.

SONG, Z. et al. Rod-Shaped Polymeric Nanoparticles Intervene Neutrophils for Efficient Ischemic Stroke Therapy. **Advanced Functional Materials**, v. 33, n. 19, p. 2212326, 2023.

SOTNIKOV, D. V. et al. Adsorption of proteins on gold nanoparticles: One or more layers? **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 173, p. 557–563, 1 jan. 2019.

SOUSA, A. A. et al. Synthesis, Characterization, and Direct Intracellular Imaging of Ultrasmall and Uniform Glutathione-Coated Gold Nanoparticles. **Small**, v. 8, n. 14, p. 2277–2286, 23 jul. 2012.

SOUSA, A. A. et al. Biointeractions of ultrasmall glutathione-coated gold nanoparticles: effect of small size variations. **Nanoscale**, v. 8, n. 12, p. 6577–6588, 17 mar. 2016a.

SOUSA, A. A. et al. Biointeractions of ultrasmall glutathione-coated gold nanoparticles: effect of small size variations. **Nanoscale**, v. 8, n. 12, p. 6577–6588, 17 mar. 2016b.

STELLER, H. Mechanisms and genes of cellular suicide. **Science (New York, N.Y.)**, v. 267, n. 5203, p. 1445–1449, 10 mar. 1995.

STRANO, M. S. (Invited) Corona Phase Molecular Recognition (CoPhMoRe) to Enable New Nanosensor Interfaces. **ECS Meeting Abstracts**, v. MA2015-01, n. 5, p. 753, 29 abr. 2015.

TERSTAPPEN, G. C. et al. Strategies for delivering therapeutics across the blood–brain barrier. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 20, n. 5, p. 362–383, maio 2021.

THAYABARANATHAN, T. et al. Global stroke statistics 2022. **International Journal of Stroke**, v. 17, n. 9, p. 946–956, 1 out. 2022.

THOMPSON, C. B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease.¹ **Science (New York, N.Y.)**, v. 267, n. 5203, p. 1456–1462, 10 mar. 1995.

THORNBERRY, N. A. et al. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. **Nature**, v. 356, n. 6372, p. 768–774, 30 abr. 1992.

THORNBERRY, N. A.; LAZEBNIK, Y. Caspases: enemies within. **Science (New York, N.Y.)**, v. 281, n. 5381, p. 1312–1316, 28 ago. 1998.

TLILI, I.; ALKANHAL, T. A. Nanotechnology for water purification: electrospun nanofibrous membrane in water and wastewater treatment. **Journal of Water Reuse and Desalination**, v. 9, n. 3, p. 232–248, 24 jan. 2019.

TOWFIGHI, A. et al. Poststroke Depression: A Scientific Statement for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. **Stroke**, v. 48, n. 2, p. e30–e43, fev. 2017.

TRUONG, V.-T. et al. Multi-walled carbon nanotubes of 200 nm diameter and carbon micro- balloons. 2010 International Conference on Nanoscience and Nanotechnology. **Anais...** Em: 2010 INTERNATIONAL CONFERENCE ON NANOSCIENCE AND NANOTECHNOLOGY. fev. 2010. Disponível em: https://ieeexplore.ieee.org/abstract/document/6045178?casa_token=rv9656R9luQAAA:79K5MJgO7vdcOSoAzWgj0atMTXq7oh_OtdtWnA5IAZhQ7ftTTjzL3gqk6PrcWXcyrOd1NEATR9A. Acesso em: 31 jul. 2024.

TSAO, C. W. et al. Heart Disease and Stroke Statistics—2023 Update: A Report From the American Heart Association. **Circulation**, v. 147, n. 8, 21 fev. 2023.

TSOI, K. M. et al. Mechanism of hard-nanomaterial clearance by the liver. **Nature Materials**, v. 15, n. 11, p. 1212–1221, nov. 2016.

TUO, Q.; ZHANG, S.; LEI, P. Mechanisms of neuronal cell death in ischemic stroke and their therapeutic implications.² **Medicinal Research Reviews**, v. 42, n. 1, p. 259–305, 2022.

TURKEVICH, J.; STEVENSON, P. C.; HILLIER, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. **Discussions of the Faraday Society**, v. 11, n. 0, p. 55–75, 1 jan. 1951.

UPADHYAY, N. et al. Development of sensitive magnetic nanoparticle assisted rapid sandwich assay(s-MARSA) to monitor Parkinson's disease and Schizophrenia pharmacotherapy.³ **Analytical Biochemistry**, v. 667, p. 115082, 15 abr. 2023.

UZDENSKY, A. B. Apoptosis regulation in the penumbra after ischemic stroke: expression of pro- and antiapoptotic proteins.⁴ **Apoptosis**, v. 24, n. 9, p. 687–702, 1 out. 2019.

VAISHANAV, S. K. et al. Protein nanoparticle interaction: A spectrophotometric approach for adsorption kinetics and binding studies. **Journal of Molecular Structure**, v. 1117, p. 300–310, 5 ago. 2016.

VALADÃO, K. M. G. et al. Nanotechnology in Improving the Treatment of Huntington's Disease: a Systematic Review. **Neurotoxicity Research**, v. 40, n. 2, p. 636–645, 1 abr. 2022.

VAN DEN ANKER, J. et al. Developmental Changes in Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 58, n. S10, p. S10–S25, 2018.

VERGARA-CASTAÑEDA, H. et al. Gold nanoparticles bio-reduced by natural extracts of arantho (*Kalanchoe daigremontiana*) for biological purposes: physicochemical, antioxidant and antiproliferative evaluations.⁵ **Materials Research Express**, v. 6, n. 5, p. 055010, fev. 2019.

VERMEHREN, P. et al. Cooperation between NMDA-Type Glutamate and P2 Receptors for Neuroprotection during Stroke: Combining Astrocyte and Neuronal Protection.⁶ **Neuroglia**, v. 1, n. 1, p. 30–47, set. 2018.

VIJAYAKUMAR, S.; GANESAN, S. In Vitro Cytotoxicity Assay on Gold Nanoparticles with Different Stabilizing Agents.⁷ **Journal of Nanomaterials**, v. 2012, p. e734398, 4 set. 2012.

VINLUAN, R. D. I. et al. Glutathione-Coated Luminescent Gold Nanoparticles: A Surface Ligand for Minimizing Serum Protein Adsorption.⁸ **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 6, n. 15, p. 11829–11833, 13 ago. 2014.

WALKER, N. P. et al. Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)₂ homodimer. **Cell**, v. 78, n. 2, p. 343–352, 29 jul. 1994.

WANG, A. et al. High lactate dehydrogenase was associated with adverse outcomes in patients with acute ischemic stroke or transient ischemic attack.⁹ **Annals of Palliative Medicine**, v. 10, n. 10, p. 101850195–101810195, out. 2021.

WANG, H. et al. Exogenous glutathione exerts a therapeutic effect in ischemic stroke rats by interacting with intrastriatal dopamine.¹⁰ **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 43, n. 3, p. 541–551, mar. 2022.

WANG, P. et al. Interaction of gold nanoparticles with proteins and cells. **Science and Technology of Advanced Materials**, v. 16, n. 3, p. 034610, 18 jun. 2015.

WANG, Y. et al. Biodegradable polymeric nanoparticles containing gold nanoparticles and Paclitaxel for cancer imaging and drug delivery using photoacoustic methods.¹¹ **Biomedical Optics Express**, v. 7, n. 10, p. 4125–4138, 1 out. 2016.

WANG, Y. et al. Enhancement effect of p-iodophenol on gold nanoparticle-catalyzed chemiluminescence and its applications in detection of thiols and guanidine. **Talanta**, v. 182, p. 523–528, 15 maio 2018.

WESLEY, U. V. et al. Galectin-3 protects against ischemic stroke by promoting neuro- angiogenesis via apoptosis inhibition and Akt/Caspase regulation.¹² **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 41, n. 4, p. 857–873, 1 abr. 2021.

WESTERGAARD, E.; BRIGHTMAN, M. W. Transport of proteins across normal cerebral arterioles.¹³ **The Journal of Comparative Neurology**, v. 152, n. 1, p. 17–44, 1 nov. 1973.

WILLIAMS, G. T.; SMITH, C. A. Molecular regulation of apoptosis: genetic controls on cell death.¹⁴ **Cell**, v. 74, n. 5, p. 777–779, 10 set. 1993.

WILSON, K. P. et al. Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme. **Nature**, v. 370, n. 6487, p. 270–275, 28 jul. 1994.

WINKLER, E. A.; BELL, R. D.; ZLOKOVIC, B. V. Central nervous system pericytes in health and disease. **Nature Neuroscience**, v. 14, n. 11, p. 1398–1405, 26 out. 2011.

WU, D. et al. The blood–brain barrier: structure, regulation, and drug delivery. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 8, n. 1, p. 1–27, 25 maio 2023.

WU, K.-J. et al. Green Tea Extract Ameliorates Learning and Memory Deficits in Ischemic Rats via Its Active Component Polyphenol Epigallocatechin-3-gallate by Modulation of Oxidative Stress and Neuroinflammation.¹⁵ **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine: eCAM**, v. 2012, p. 163106, 2012.

WU, R. H. et al. A facile route to tailoring peptide-stabilized gold nanoparticles using glutathione as a synthon.¹⁶ **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 19, n. 5, p. 6754–6775, 23 maio 2014.

WUITHSCHICK, M. et al. Turkevich in New Robes: Key Questions Answered for the Most Common Gold Nanoparticle Synthesis. **ACS Nano**, v. 9, n. 7, p. 7052–7071, 28 jul. 2015.

XU, H. et al. Micro/Nano Technology for Next-Generation Diagnostics. **Small Methods**, v. 4, n. 4, p. 1900506, 2020.

XU, H. et al. Neuritin has a neuroprotective role in the rat model of acute ischemia stroke by inhibiting neuronal apoptosis and NLRP3 inflammasome.¹⁷ **Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases**, v. 32, n. 12, p. 107391, 1 dez. 2023a.

XU, L. et al. Neuroprotective effects of autophagy inhibition on hippocampal glutamate receptor subunits after hypoxia-ischemia-induced brain damage in newborn rats.¹⁸ **Neural Regeneration Research**, v. 12, n. 3, p. 417–424, mar. 2017.

XU, M. et al. Size-Dependent In Vivo Transport of Nanoparticles: Implications for Delivery, Targeting, and Clearance. **ACS Nano**, v. 17, n. 21, p. 20825–20849, 14 nov. 2023b.

YABUKI, Y.; FUKUNAGA, K. Oral administration of glutathione improves memory deficits following transient brain ischemia by reducing brain oxidative stress. **Neuroscience**, v. 250, p. 394–407, 10 out. 2013.

YANG, B. et al. The characterization of the concentration of the single-walled carbon nanotubes in aqueous dispersion by UV-Vis-NIR absorption spectroscopy. **The Analyst**, v. 138, n. 21, p. 6671, 2013.

YANG, D. et al. Mitigation of Carbon Nanotube Neurosensor Induced Transcriptomic and Morphological Changes in Mouse Microglia with Surface Passivation. **ACS Nano**, v. 14, n. 10, p. 13794–13805, 27 out. 2020.

YANG, S. J. et al. Synaptic scale dopamine disruption in Huntington's Disease model mice imaged with near infrared catecholamine nanosensors.¹⁹ **bioRxiv**, 21 set. 2022. Disponível em: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.09.19.508617v1>. Acesso em: 31 jul. 2024.

YU, Y. et al. Efficacy of Temozolomide-Conjugated Gold Nanoparticle Photothermal Therapy of Drug-Resistant Glioblastoma and Its Mechanism Study. **Molecular Pharmaceutics**, v. 19, n. 4, p. 1219–1229, 4 abr. 2022.

YUAN, J. et al. The C. elegans cell death gene ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme.²⁰ **Cell**, v. 75, n. 4, p. 641–652, 19 nov. 1993.

ZABETAKIS, K. et al. Effect of high gold salt concentrations on the size and polydispersity of gold nanoparticles prepared by an extended Turkevich–Frens method. **Gold Bulletin**, v. 45, n. 4, p. 203–211, 1 dez. 2012.

ZEYNALOO, E. et al. Design of a mediator-free, non-enzymatic electrochemical biosensor for glutamate detection. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 31, p. 102305, 1 jan. 2021.

ZHANG, C. et al. Progress, challenges, and future of nanomedicine. **Nano Today**, v. 35, p. 101008, 1 dez. 2020.

ZHANG, J. et al. A rapid, direct, quantitative, and label-free detector of cardiac biomarker troponin T using near-infrared fluorescent single-walled carbon nanotube sensors. **Advanced Healthcare Materials**, v. 3, n. 3, p. 412–423, mar. 2014a.

ZHANG, J.; CHEN, Z.; CHEN, Q. Advanced Nano-Drug Delivery Systems in the Treatment of Ischemic Stroke. **Molecules**, v. 29, n. 8, p. 1848, jan. 2024.

ZHANG, J.; MOU, L.; JIANG, X. Surface chemistry of gold nanoparticles for health-related applications. **Chemical Science**, v. 11, n. 4, p. 923–936, 2020.

ZHANG, L. et al. Research progress on the mechanism of curcumin in cerebral ischemia/reperfusion injury: a narrative review. **Apoptosis**, v. 28, n. 9, p. 1285–1303, 1 out. 2023.

ZHANG, S. et al. Advanced drug delivery system against ischemic stroke. **Journal of Controlled Release**, v. 344, p. 173–201, 1 abr. 2022.

ZHANG, T.-T. et al. Strategies for transporting nanoparticles across the blood-brain barrier. **Biomaterials Science**, v. 4, n. 2, p. 219–229, fev. 2016.

ZHANG, X. et al. Advances in nanomedicines for diagnosis of central nervous system disorders. **Biomaterials**, v. 269, p. 120492, 1 fev. 2021.

ZHANG, X.-D. et al. Enhanced tumor accumulation of sub-2 nm gold nanoclusters for cancer radiation therapy.²¹ **Advanced Healthcare Materials**, v. 3, n. 1, p. 133–141, jan. 2014b.

ZHAO, J. et al. Activated astrocytes attenuate neocortical seizures in rodent models through driving Na⁺-K⁺-ATPase.²² **Nature Communications**, v. 13, p. 7136, 21 nov. 2022.

ZHAO, X. et al. Exploring the diameter and surface dependent conformational changes in carbon nanotube-protein corona and the related cytotoxicity. **Journal of Hazardous Materials**, v. 292, p. 98–107, 15 jul. 2015.

ZHAO, Y. et al. Nano-liposomes of lycopene reduces ischemic brain damage in rodents by regulating iron metabolism.²³ **Free Radical Biology and Medicine**, v. 124, p. 1–11, 20 ago. 2018.

ZHAO, Y.; SULTAN, D.; LIU, Y. 2 - Biodistribution, Excretion, and Toxicity of Nanoparticles. Em: CUI, W.; ZHAO, X. (Eds.). **Theranostic Bionanomaterials**. Micro and Nano Technologies. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 27–53.

ZHENG, X. J.; CHOW, J. C. L. Radiation dose enhancement in skin therapy with nanoparticle addition: A Monte Carlo study on kilovoltage photon and megavoltage electron beams. **World Journal of Radiology**, v. 9, n. 2, p. 63–71, 28 fev. 2017.

ZHENG, Y. et al. Intrinsic Effects of Gold Nanoparticles on Oxygen-Glucose Deprivation/Reperfusion Injury in Rat Cortical Neurons. **Neurochemical Research**, v. 44, n. 7, p. 1549–1566, jul. 2019a.

ZHENG, Y. et al. Intrinsic Effects of Gold Nanoparticles on Oxygen-Glucose Deprivation/Reperfusion Injury in Rat Cortical Neurons. **Neurochemical Research**, v. 44, n. 7, p. 1549–1566, jul. 2019b.

ZHOU, C. et al. Luminescent Gold Nanoparticles with Mixed Valence States Generated from Dissociation of Polymeric Au(I) Thiolates. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 114, n. 17, p. 7727–7732, 6 maio 2010.

ZHOU, Y. et al. Genetic analysis of tissue glutathione concentrations and redox balance. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 71, p. 157–164, jun. 2014.