



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA



**ANÁLISE DAS VIAS ENDOCÍTICAS DE MACRÓFAGOS
MURINOS NA INTERAÇÃO COM UM IMUNÓGENO COMPOSTO
POR NANOBASTÕES DE OURO FUNCIONALIZADOS COM A
PROTEÍNA E DE *Dengue virus 3***

HELTON LUÍS DE SOUZA

Belo Horizonte
Fevereiro de 2016

**ANÁLISE DAS VIAS ENDOCÍTICAS DE MACRÓFAGOS
MURINOS NA INTERAÇÃO COM UM IMUNÓGENO COMPOSTO
POR NANOBASTÕES DE OURO FUNCIONALIZADOS COM A
PROTEÍNA E DE *Dengue virus 3***

HELTON LUÍS DE SOUZA

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação do
Departamento de Microbiologia,
Instituto de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Minas Gerais,
como requisito necessário à formação
como Mestre em Microbiologia.

Orientação: Prof. Flávio Guimarães da
Fonseca

Belo Horizonte
Fevereiro de 2016

043 Souza, Helton Luís de.
Análise das interações entre um imunógeno composto por nanobastões de ouro funcionalizados com a proteína E de Dengue vírus 3 e macrófagos murinos [manuscrito] / Helton Luís de Souza. - 2016.

115 : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Guimarães da Fonseca.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

1. Nanopartículas. 2. Ouro. 3. Vírus da Dengue. 4. Macrófagos. 5. Proteínas Sanguíneas. 6. Endocitose. I. Fonseca, Flávio Guimarães da. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

OK

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE HELTON LUIS DE SOUZA
Nº REGISTRO: 2014693913
Relatora e Suplente: Profa. Edel Figueiredo Barbosa Stancioli

Às 14:00 horas do dia 23 de fevereiro de 2016, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Aristóbolo Mendes da Silva (Departamento de Morfologia/ICB/UFMG), Lídia Maria de Andrade (Pós-nda Departamento de Física/UFMG) e o Prof. Flávio Guimarães da Fonseca - Orientador, para julgar o trabalho final "Análise das interações entre um imunógeno composto por nanobastões de ouro funcionalizados com a proteína e de *Dengue virus 3* e macrófagos murinos", do aluno **Helton Luís de Souza**, requisito final para a obtenção do Grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Paulo César Peregrino Ferreira - Coordenador do Programa, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição de resultado final. O candidato foi considerado **APROVADO**. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 23 de fevereiro de 2016.

Dr. Aristóbolo Mendes da Silva

Dra. Lídia Maria de Andrade

Prof. Flávio Guimarães da Fonseca (Orientador)

Prof. Paulo César Peregrino Ferreira
Coordenador

“Quanto mais alto voamos,
menores parecemos aos olhos
daqueles que não sabem voar.”

Friedrich Nietzsche

Agradecimentos

A realização deste trabalho somente foi possível com a contribuição dos colegas de laboratório. Sou imensamente grato a todos, que além de terem participado do meu aprimoramento profissional, também contribuíram com a minha evolução pessoal. Todo o aprendizado ao longo desses dois anos possibilitou a formação de novas opiniões e ideias que modificaram a forma como vejo a ciência e o mundo.

Gostaria de agradecer à minha mãe e ao meu irmão. Ambos me apoiaram desde o momento em que decidi deixar o trabalho para voltar a estudar.

Agradeço também aos amigos, os de longa data e as amizades recentes, que, como minha família, deram-me suporte emocional nos momentos em que mais precisei. Especialmente ao João Paulo (Gazélio), grande amigo que conheci durante a graduação.

Agradeço ao professor Flávio, por me receber no laboratório sem mesmo me conhecer pessoalmente, e por ter aceitado me orientar nessa empreitada. Da mesma forma, agradeço à professora Edel pelas ideias, sugestões e palavras de apoio recebidas com muito carinho.

Agradeço à Alice por toda a ajuda no entendimento do mundo nano, desde os conceitos físicos mais básicos até os macetes do trabalho de bancada.

Agradeço ao Thiago, que se mostrou interessado no meu trabalho e que colaborou com muitas ideias na tentativa de solucionar os problemas que apareceram.

Agradeço à Iracema, parceira de prosa no caminho de ida pra casa, onde uma grande amizade nasceu e se fortaleceu, a qual pretendo levar para toda vida.

Agradeço também a todos do LVBA, que contribuíram de alguma forma com essa nova experiência para mim que foi o mestrado.

Agradeço à Marliete e à Heliana pela ajuda com o cultivo primário de células. Sempre foram muito solícitas. Agradeço também ao Rafael pelas análises de microscopia confocal.

Agradeço às agências de fomento, CAPES e CNPq, pelo suporte que viabilizou o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço ao Nanobiomedical Research Group, que, apesar do breve tempo em que convivemos, proporcionou-me um ambiente de conhecimento.

Por fim, agradeço à banca examinadora pelo aceite do convite e pelo tempo empenhado na correção e discussão deste trabalho.

Obrigado!

Sumário

Sumário.....	8
Lista de Abreviaturas.....	11
Lista de Figuras.....	13
Resumo.....	16
Abstract.....	18
I – Revisão Bibliográfica.....	19
1. Nanotecnologia	20
1.1. Características Gerais das Nanopartículas de Ouro.....	20
1.2. Propriedades Plasmônicas dos Nanobastões de Ouro.....	21
1.3. Síntese de Nanobastões de Ouro.....	22
1.4. Funcionalização de Nanopartículas de Ouro	23
1.5. Citotoxicidade dos Nanobastões de Ouro.....	26
1.6. Aplicações Biomédicas dos Nanobastões de Ouro.....	27
1.6.1. Diagnóstico, Imagem Molecular e Terapia Fototermal.....	27
1.6.2. Entrega de Genes e Drogas	29
1.6.3. Biossensores e Vacinas.....	30
2. Interação entre Nanopartículas de Ouro e Sistemas Biológicos	31
2.1. Interação entre Nanopartículas de Ouro e Proteínas.....	32
2.2 Vias de Penetração das Nanopartículas de Ouro nas Células	35
2.2.1 Mecanismos de Endocitose	35
2.2.2 Endocitose de Nanopartículas de Ouro	39
3. O vírus da Dengue	45
3.1 Estrutura e Função da Proteína E.....	45
3.2 Resposta Imunológica frente à Imunização com o Protótipo Vacinal baseado em Nanobastões de Ouro Funcionalizados com a Proteína E	46
II – Justificativa.....	48

III – Objetivos	50
1. Objetivo Geral	51
2. Objetivos Específicos	51
IV – Metodologia	52
1. Nanobastões de Ouro	53
1.1. Obtenção dos Nanobastões de Ouro.....	53
1.2. Funcionalização dos Nanobastões de Ouro	53
1.2.1. Ligação ao Ácido Lipóico	53
1.2.2. Ligação aos Reagentes Intermediários e Reação de Substituição pela Proteína	54
1.3. Verificação de Eficiência da Funcionalização	55
2. Interações entre Nanobastões de Ouro e Sistemas Biológicos.....	56
2.1 Avaliação das Vias de Internalização dos Nanobastões de Ouro por Macrófagos Murinos.....	56
2.1.1 Obtenção de Macrófagos Murinos Derivados de Medula Óssea	56
2.1.2 Estabelecimento da Concentração de Células	57
2.1.3 Estabelecimento da Concentração de Nanopartículas, Inibidores de Endocitose, do Diluente e da Citotoxicidade do CTAB	58
2.1.4 Avaliação das Vias de Internalização através de Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)	60
2.1.5 Avaliação das Vias de Internalização através de Citometria de Fluxo	61
2.1.6 Avaliação das Vias de Internalização através de Densidade Óptica (O.D.).....	63
2.1.7 Avaliação das Vias de Internalização através de Microscopia de Fluorescência	64
V – Resultados	66
1. Funcionalização dos AuNRs	67
2. Viabilidade Celular	68

2.1 Densidade Celular.....	68
2.2 Diluente dos Inibidores de Endocitose	69
2.3 Inibidores de Endocitose	70
2.4 Nanobastões de Ouro e CTAB.....	73
3. Vias de Endocitose de AuNPs.....	75
3.1 Quantificação por Microscopia Eletrônica	75
3.2 Quantificação por Citometria de Fluxo	77
3.3 Quantificação por Densidade Óptica.....	80
3.4 Análise dos AuNRs por Microscopia de Fluorescência.....	83
VI – Discussão	86
VII – Conclusões e perspectivas	98
VIII – Referências Bibliográficas.....	101
IX – Anexos	111

Lista de Abreviaturas

AuNPs – Nanopartículas de Ouro (*Gold Nanoparticles*)

AuNRs – Nanobastões de Ouro (*Gold Nanorods*)

BMDM – Macrófagos Derivados da Medula Óssea (*Bone Marrow Derived Macrophages*)

CEUA – Comitê de Ética em Uso Animal

CTAB – Brometo de Cetiltrimetilamônio (*Cetyltrimethylammonium Bromide*)

DENV3E – Proteína E do *Dengue vírus 3*

DIC – Contraste de Interferência Diferencial (*Differential Interference Contrast*)

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido Desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic Acid*)

EDAC – Cloridrato de N-etil-N'-(3-Dimetilaminopropil) carbodiimida (*1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl) Carbodiimide*)

EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (*Ethylenediamine tetraacetic acid*)

FP – Peptídeo de Fusão (*Fusion Peptide*)

GFP – Proteína Verde Fluorescente (*Green Fluorescence Protein*)

GM-CSF – Fator Estimulador de Colônias de Macrófagos e Granulócitos (*Granulocyte Macrophage – Colony Stimulating Factor*)

EGFR – Receptor de Fator de Crescimento Epidermal (*Epidermal Growth Factor Receptor*)

ICAM-1 – Molécula de Adesão Intracelular – 1 (*Intercellular Adhesion Molecule-1*)

IFN- γ – Interferon- γ

IL-2 – Interleucina-2

LDL – Lipoproteína de Baixa Densidade (*Low Density Lipoprotein*)

LSPR – Ressonância Plasmônica de Superfície Localizada (*Localized Surface Plasmon Resonance*)

MTT – Método de Redução do Tetrazólio

NHS – N-hidroxisuccinimida (*N-hydroxysuccinimide*)

NIR – Região Próxima do Infravermelho (*Near-Infrared*)

OD – Densidade Óptica

PBS – Tampão Fosfato-Salino (*Phosphate-Buffered Saline*)

PEG – Polietilenoglicol

PEO – Polietileno-óxido

PRNT₅₀: Teste de Neutralização de Redução de Placa (*Plaque Reduction Neutralization Test*)

RPMI – *Roswell Park Memorial Institute*

RSV – Vírus Sincicial Respiratório (*Respiratory Syncytial Virus*)

SFB – Soro Fetal Bovino

siRNA – Pequeno RNA de Interferência (*Small Interfering RNA*)

TA – Ácido Lipóico (*Teichoic Acid*)

TEM – Microscopia Eletrônica de Transmissão (*Transmission Electron Microscopy*)

TRITC - Isotiocianato de Tetrametilrodamina (*Tetramethylrhodamine*)

Lista de Figuras

Figura 1. Diferentes tipos de nanopartículas de ouro	20
Figura 2. Interação entre a luz polarizada e os nanobastões de ouro causando a ressonância plasmônica de superfície	22
Figura 3. Síntese de nanobastão de ouro mediada por “semente” com crescimento direcionado pelo CTAB	23
Figura 4. Diferentes formas de funcionalização de nanopartículas de ouro	24
Figura 5. Deslocamento da curva de ressonância plasmônica de superfície após o nanobastão de ouro (AuNR) ser funcionalizado com ácido lipóico.....	25
Figura 6. Evolução das nanopartículas de ouro no ambiente extracelular	34
Figura 7. Vias de endocitose do conteúdo extracelular	37
Figura 8. Transporte intracelular de nanopartículas de ouro	41
Figura 9. Influência da densidade de PEG (polietilenoglicol) na adsorção de proteínas séricas sobre a superfície das nanopartículas de ouro	42
Figura 10. Endocitose de AuNPs mediada ou não por receptor.....	44
Figura 11. Estrutura da proteína E dimerizada	46
Figura 12. Indução de resposta humoral e celular em camundongos imunizados com os nanobastões de ouro funcionalizados com a proteína DENV3E.....	47
Figura 13. Desenho esquemático do processo de funcionalização.....	54
Figura 14. Funcionalização dos AuNRs	67
Figura 15. Saturação da funcionalização dos AuNRs	68
Figura 16. Viabilidade celular quanto à densidade celular	69
Figura 17. Viabilidade celular quanto à concentração de DMSO	70
Figura 18. Viabilidade celular quanto à concentração de <i>cytochalasin D</i>	71
Figura 19. Viabilidade celular quanto à concentração de <i>dynasore</i>	72
Figura 20. Viabilidade celular quanto à concentração de <i>5-(N,N-dimethyl) amiloride hydrochloride</i>	72
Figura 21. Viabilidade celular quanto à concentração de <i>filipin III</i>	73
Figura 22. Viabilidade celular quanto à concentração de AuNRs não funcionalizados.....	74

Figura 23. Viabilidade celular quanto à concentração de AuNRs funcionalizados com a proteína E	74
Figura 24. Viabilidade celular quanto à concentração de CTAB.....	75
Figura 25. Micrografias de macrófagos murino contendo AuNRs no interior de vesículas	76
Figura 26. Quantificação de AuNRs endocitados por macrófagos	77
Figura 27. Marcação fluorescente de células RAW 264.7 dos grupos controle, incubado com os AuNRs não funcionalizados, incubados com a proteína DENV3E e com os AuNRs funcionalizados com esta proteína.....	78
Figura 28. Quantificação da proteína DENV3E pura ou funcionalizada aos AuNRs em células RAW264.7.....	79
Figura 29. Representação das medidas de O.D. em 780 nm pelo volume de AuNRs.....	81
Figura 30. Quantificação de AuNRs internalizados através da densidade óptica em comprimento de onda de 780 nm.....	82
Figura 31. Quantificação de AuNRs no sobrenadante através da densidade óptica em comprimento de onda de 780 nm	83
Figura 32. Imagens de DIC (do inglês, <i>Differential Interference Contrast</i>) do controle de células, sem qualquer tratamento e das células incubadas apenas com o anticorpo secundário para controle da especificidade de ligação.....	83
Figura 33. Imagens de DIC e de fluorescência das células não permeabilizadas e incubadas com os AuNRs funcionalizados com a proteína DENV3E	84
Figura 34. Imagens de DIC e de fluorescência das células permeabilizadas e incubadas com os AuNRs funcionalizados com a proteína DENV3E	85

Lista de Tabelas

Tabela 1. Inibidores de Endocitose.....	59
Tabela 2. Conclusões e perspectivas do trabalho.	100

Resumo

Os nanobastões de ouro têm se mostrado muito adequados e promissores em aplicações biomédicas. Por outro lado, a falta de informações precisas sobre a interação desses nanocompostos com organismos vivos se torna uma barreira na disseminação do seu uso. Esse tipo de caracterização é de extrema importância na abordagem vacinal, onde as interações entre células e imunógenos e a resposta gerada são essenciais para uma imunização eficiente. A interação das nanopartículas com as células pode ser influenciada por fatores como a adsorção de biomoléculas do meio e a presença de ligantes em sua superfície. Por isso, a geração de conhecimento acerca deste tema permite que o uso dessas nanopartículas seja feito de maneira mais eficiente e pontual. Com isso em mente, propomos este trabalho com o objetivo de avaliar quais vias de endocitose são atuantes na internalização de nanobastões de ouro funcionalizados ou não com a proteína E de envelope do *Dengue virus* 3, em macrófagos murinos. Também propomos avaliar a influência das proteínas séricas no direcionamento desses processos. Para isso, inibidores das vias de endocitose tiveram o grau de citotoxicidade avaliado em função de diferentes concentrações, em meio de cultura contendo ou não soro fetal bovino. O mesmo foi feito para os nanobastões de ouro (AuNRs) puros e funcionalizados. Os 4 inibidores não causaram citotoxicidade nas concentrações comumente utilizadas em outros trabalhos. A funcionalização dos AuNRs reduziu sua citotoxicidade. O perfil de viabilidade celular observado para as diluições dos AuNRs puros foi semelhante ao perfil das diluições correspondentes de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB). A quantificação dos AuNRs endocitados nas células controle e inibidas foi feita por meio de microscopia eletrônica, citometria de fluxo, densidade óptica e microscopia confocal. Nenhuma das técnicas proporcionou dados adequados para análise estatística. Apesar disso, a internalização dos AuNRs parece ser mediada por diferentes vias de endocitose, sendo que o direcionamento para uma determinada via é influenciado pela funcionalização. Esta provavelmente altera a forma como os AuNRs interagem com as proteínas séricas.

Palavras-chave: nanobastões de ouro, proteína E, *Dengue virus*, macrófagos, internalização, proteínas séricas.

Abstract

Gold nanorods have been shown to be suitable for biomedical applications. On the other hand, the lack of precise information on how these nanocomposites interact with live organisms is a barrier to its widespread use. This is of uttermost importance in vaccine approaches, where interactions between cells and immunogens, as well as the generated response are essential for efficient immunization. The interaction between nanoparticles and cells may be affected by factors such as adsorption of biomolecules from de medium and the existence of ligands on their surface. Therefore, the generation of knowledge regarding these issues may enable the use of nanoparticles in a more efficient and pinpointing way. With the above in mind, we propose this work aiming to evaluate what endocytosis pathways are active in internalization of gold nanorods functionalized or not with Dengue virus type 3 envelope protein in murine macrophages. We also propose to evaluate the influence of serum proteins in directing these processes. For this, inhibitors of endocytosis pathways had their cytotoxicity assessed to determine the concentrations of usage in both conditions: medium containing or not fetal bovine serum. This same evaluation was made to gold nanorods (AuNRs) raw and functionalized. All such inhibitors did not cause citotoxicity in concentrations commonly used in other studies. The functionalization of AuNRs reduced the cytotoxicity. The profile of cell viability observed for dilutions of raw AuNRs was extremely similar to the profile of corresponding dilutions of cetyltrimethylammonium bromide (CTAB). The quantification of endocytosed AuNRs in control and inhibited cells was done through electron microscopy, flow cytometry, optical density and confocal microscopy. None of these techniques provided statistically adequate results for analysis. Nevertheless, the internalization of AuNRs seems to be mediated by different endocytic pathways, with the predominance of a specific via influenced by functionalization what probably changes the means of how AuNRs interact with serum proteins.

Key words: gold nanorods, envelope protein, *Dengue virus*, macrophages, internalization, serum proteins.

I – Revisão Bibliográfica

1. Nanotecnologia

Materiais em escalas nanométricas têm sido amplamente pesquisados e desenvolvidos nos últimos anos. A nanotecnologia, área da ciência responsável por esses estudos, lida com materiais em escalas onde pelo menos uma de suas dimensões mede entre 1 e 100 nanômetros (PISSUWAN *et al.*, 2008).

As características físicas e químicas da matéria dependem, em parte, do movimento que os elétrons executam. Esse movimento, por sua vez, depende do espaço disponível e do tipo do material. Na escala nanométrica, o espaço para movimentação dos elétrons é pequeno, e por isso, as propriedades do material diferem daquelas observadas em escalas maiores. Além do tamanho, a forma das nanopartículas também interfere nas características físico-químicas gerais da matéria (HUANG *et al.*, 2009).

1.1. Características Gerais das Nanopartículas de Ouro

As nanopartículas de ouro (do inglês, *Gold Nanoparticles*, AuNPs) são muito adequadas para aplicações biológicas porque somam características desejáveis que podem ser manipuladas de acordo com objetivos específicos. As AuNPs apresentam picos ópticos que variam conforme o tamanho e a morfologia. Elas possuem baixa toxicidade em sistemas biológicos e suas características de superfície permitem fácil ligação a moléculas orgânicas (PISSUWAN *et al.*, 2008).

Dentre as diversas formas de AuNPs desenvolvidas e utilizadas, as nanoesferas foram as primeiras a serem estudadas. Na sequência vieram os nanobastões, nanoconchas e nanocaixas (Fig. 1) (CAI *et al.*, 2008).

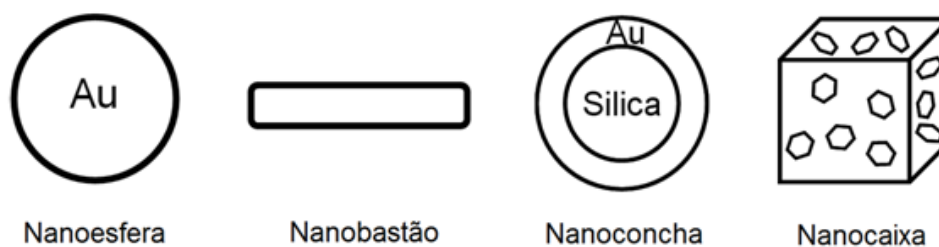


Figura 1. Diferentes tipos de nanopartículas de ouro. Au: ouro. Adaptado de CAI *et al.*, 2008.

Todas essas características se refletem em um perfil gráfico baseado na ressonância plasmônica de superfície localizada (do inglês, *Localized Surface Plasmon Resonance*, LSPR). Esse fenômeno acontece quando um espectro eletromagnético, de comprimento de onda específico, irradia a superfície de nanopartículas metálicas. Seus elétrons de superfície oscilam em ressonância com o espectro e essa ressonância se propaga ao longo da nanopartícula. A LSPR é responsável pela forte absorção de luz observada em espectrofotômetro de luz ultravioleta/visível. Além do tamanho e forma das nanopartículas, a LSPR depende das propriedades dielétricas do metal e do meio no qual as nanopartículas se encontram (HUANG *et al.*, 2009). Para as nanopartículas de ouro, a oscilação de seus elétrons acontece quando a luz incidente tem comprimento de onda na região visível ou próxima a ela (400 a 800 nm) (EL-SAYED, 2001).

1.2. Propriedades Plasmônicas dos Nanobastões de Ouro

O uso dos nanobastões de ouro (do inglês, *Gold Nanorods*, AuNRs) tem se difundido principalmente pelos avanços nos processos de síntese e pelas suas propriedades ópticas, muito úteis em métodos terapêuticos e diagnósticos. As propriedades ópticas estão diretamente relacionadas ao tamanho e forma das nanopartículas.

Os AuNRs apresentam dois modos de LSPR (Ressonância Plasmônica de Superfície Localizada): o transversal, que é a oscilação dos elétrons ao longo do diâmetro do nanobastão; e o longitudinal, sendo este a oscilação ao longo do comprimento do nanobastão (Fig. 2a). O pico (representado graficamente) da ressonância transversal acontece pela excitação dos elétrons por ondas eletromagnéticas de aproximadamente 520 nm (comprimento de onda da luz verde) (Fig. 2b). A ressonância longitudinal aparece em comprimentos de onda maiores que os da ressonância transversal. Portanto, gráficos de LSPR contendo essas características são exclusivos de AuNRs. Nanopartículas de outras formas (esferas, caixas) terão padrões gráficos diferentes (KELLY *et al.*, 2003; HUANG *et al.*, 2009).

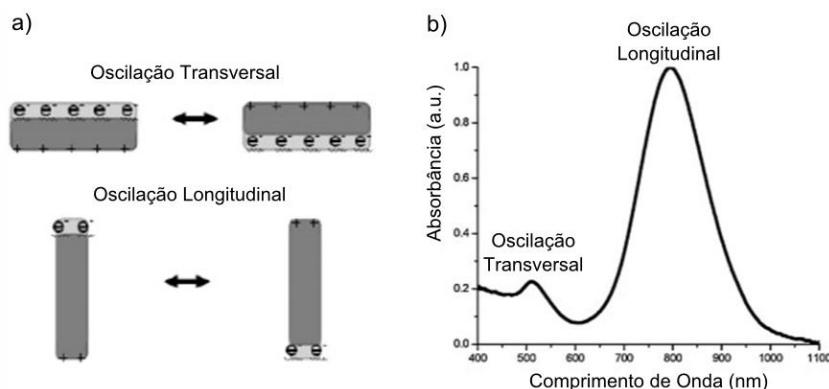


Figura 2. Interação entre a luz polarizada e os nanobastões de ouro causando a ressonância plasmônica de superfície. a) Quando um feixe de luz irradia os nanobastões, seus elétrons de superfície podem oscilar no sentido transversal ou longitudinal. O tipo de oscilação depende do comprimento de onda da luz utilizada para excitar os elétrons. b) Graficamente, as oscilações são representadas por picos. O pico da oscilação transversal se localiza na região de comprimento de onda da luz verde e é menor, em termos de absorvância, que o pico da oscilação longitudinal que é encontrado em comprimentos de onda maiores. nm: nanômetros. Adaptado de HUANG *et al.*, 2009.

O fato de AuNRs possuírem oscilações longitudinais que geralmente acontecem em comprimentos de onda maiores que 700 nm é muito atraente para aplicações terapêuticas. Água e hemácias são os principais absorventes de luz visível e infravermelha em tecidos de seres vivos. No entanto, esses dois componentes têm seus menores coeficientes de absorção em comprimentos de onda entre 700 e 900 nm, a região próxima do infravermelho (do inglês, *Near-Infrared*, NIR) (WEISSLEDER, 2001). Dessa forma, nanobastões com LSPR nesse intervalo de comprimento de onda minimizam o risco de danos às células saudáveis pela irradiação quando usados em terapias *in vivo* (PISSUWAN *et al.*, 2008).

1.3. Síntese de Nanobastões de Ouro

A síntese de AuNRs pode ser feita por diferentes métodos. O mais utilizado é o de crescimento mediado por “semente”. A solução “semente”, fonte de nanopartículas de ouro de aproximadamente 1,5 nm de diâmetro, é feita reduzindo-se o ácido cloroáurico (HAuCl_4) pelo boroidreto (BH_4^-) na presença de brometo de cetiltrimetilamônio (do inglês, *Cetyltrimethylammonium Bromide*, CTAB). Essas partículas formadas são os cernes a partir dos quais os nanobastões são sintetizados. A solução de crescimento é a fonte de Au^+ . Ela é obtida através da redução do HAuCl_4 pelo ácido ascórbico. Adicionando a solução de crescimento à solução “semente” na presença de CTAB e nitrato de

prata (AgNO_3), tem-se a formação dos nanobastões. O CTAB é um surfactante que se liga preferencialmente às faces longitudinais das nanopartículas de ouro. Dessa forma, apenas as extremidades ficam livres para a deposição do ouro, favorecendo o crescimento em bastão (Fig. 3). O AgNO_3 auxilia no controle da forma e do aspecto (razão comprimento x diâmetro) dos nanobastões. O aspecto também é controlado pela proporção de solução “semente” e de crescimento (IOSIN *et al.*, 2009; DREADEN, *et al.*, 2012; PÉREZ-JUSTE, *et al.*, 2005). Esse método de síntese é preferencialmente utilizado por ser de simples execução, pela facilidade no controle do tamanho das partículas e por prover nanobastões de alta qualidade (homogeneidade de tamanho e preservação da forma) e em grandes quantidades (JOHNSON *et al.*, 2002; HUANG *et al.*, 2009).

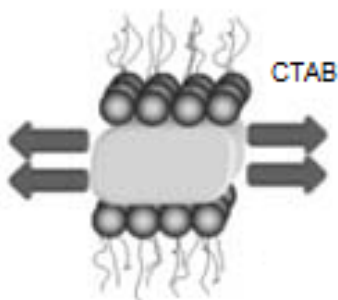


Figura 3. Síntese de nanobastão de ouro mediada por “semente” com crescimento direcionado pelo CTAB. Este se liga preferencialmente às faces longitudinais dos nanobastões, disponibilizando apenas as extremidades para a deposição dos íons de ouro, e conseqüentemente, promovendo o crescimento em forma de bastão. CTAB: *Cetyltrimethylammonium Bromide*. Adaptado de SALEM *et al.*, 2007.

1.4. Funcionalização de Nanopartículas de Ouro

A conjugação de biomoléculas com nanopartículas, processo denominado funcionalização, está sendo amplamente explorada devido ao ganho de função que essa estratégia proporciona nas mais variadas aplicações. A funcionalização das nanopartículas de ouro (AuNPs) pode ser feita de quatro formas principais (Fig. 4): adsorção eletrostática, conjugação com ligante da superfície do nanobastão, conjugação a pequenos cofatores que a proteína pode reconhecer e se ligar, e conjugação direta com a superfície do nanobastão. Dada a variedade de estratégias existentes para

funcionalização, fatores como especificidade e estabilidade de ligação devem ser levados em conta para escolha do método mais apropriado (AUBIN-TAM *et al.*, 2008).

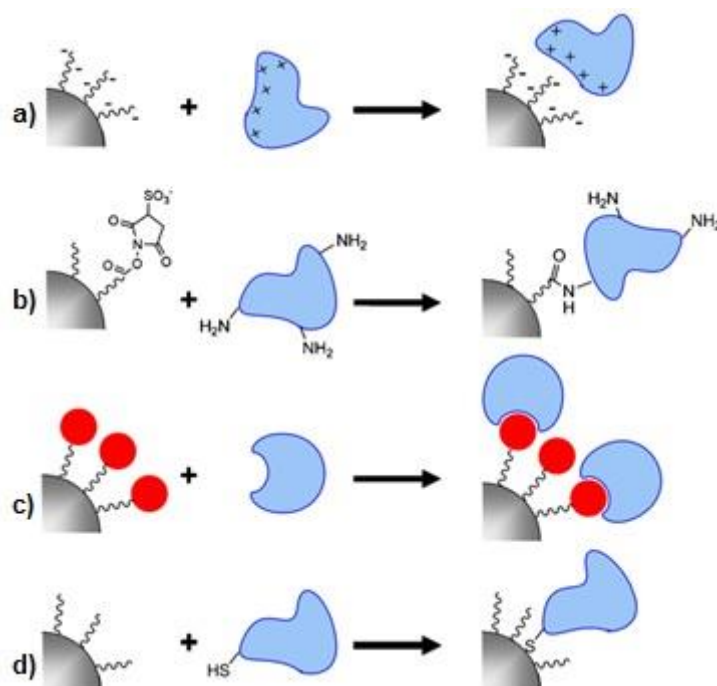


Figura 4. Diferentes formas de funcionalização de nanopartículas de ouro. a) Adesão eletrostática, b) ligação covalente ao ligante de superfície, c) ligação da proteína ao cofator de superfície e d) ligação direta à superfície do nanobastão. Fonte: AUBIN-TAM *et al.*, 2008.

A adsorção eletrostática (Fig. 4a) é a abordagem mais utilizada e de simples execução, pois não requer reações químicas. A interação entre as AuNPs e os ligantes pode ser modulada pelo pH ou pela força iônica do meio (PISSUWAN *et al.*, 2007).

Outro método de funcionalização amplamente adotado envolve a ligação covalente (Fig. 4b) entre a molécula de interesse e o ligante de superfície da nanopartícula. Proteínas contendo lisina podem se ligar covalentemente através da amina primária desse aminoácido ao éster NHS (N-Hidroxissuccinimida), previamente ligado à superfície das AuNPs (WANG *et al.*, 2002).

Dentre as interações envolvendo cofatores de superfície (Fig. 4c), destaca-se a funcionalização de AuNPs com anticorpos para detecção de antígenos específicos. As pontes dissulfeto da região dobradiça dos anticorpos

são reduzidas a fim de se obter tióis livres que se associam naturalmente à superfície das nanopartículas de ouro (ACKERSON *et al.*, 2006).

O ouro tem a propriedade intrínseca de se ligar a átomos de enxofre. Por isso, proteínas contendo o aminoácido cisteína (através do grupo tiol em sua cadeia lateral) podem se ligar diretamente à superfície das AuNPs (Fig. 4d). Ambos só precisam ser incubados juntos para que a reação ocorra (AUBIN-TAM *et al.*, 2005).

Independentemente do método de funcionalização empregado, sua eficiência pode ser monitorada e avaliada por diferentes técnicas, dentre elas, o deslocamento da curva gráfica de ressonância plasmônica de superfície (Fig. 5). Esse deslocamento é resultado da alteração da ressonância plasmônica das AuNPs causada por modificações em suas superfícies (funcionalização).

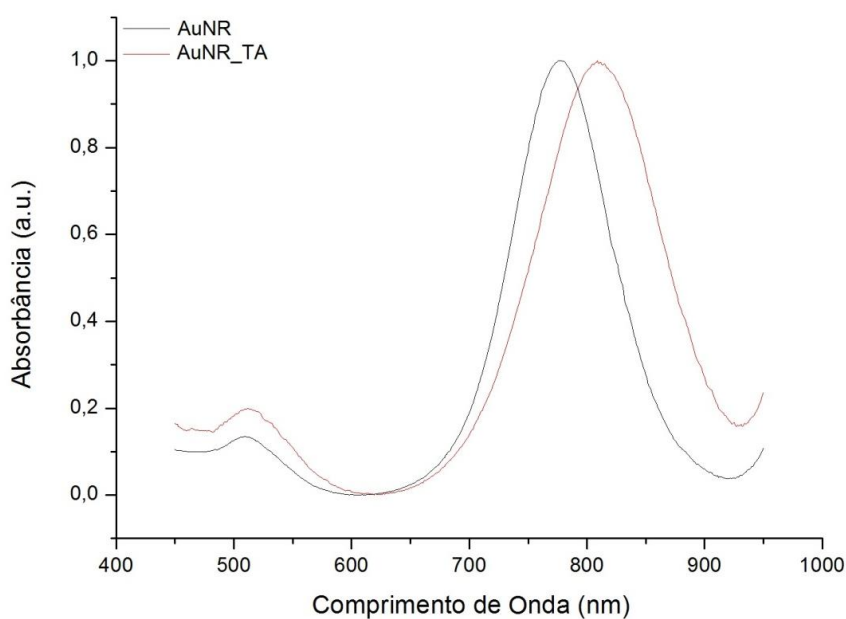


Figura 5. Deslocamento da curva de ressonância plasmônica de superfície após o nanobastão de ouro (AuNR) ser funcionalizado com ácido lipóico (do inglês, *teichoic acid*, TA). A curva em preto se refere ao nanobastão de ouro puro. O pico de excitação se encontra no comprimento de onda de 772 nm. Após o AuNR ser funcionalizado com o ácido lipóico, há um deslocamento da curva (em vermelho) para a direita (*red-shift*), alterando o pico de excitação para 810 nm.

Um dos mais importantes efeitos na funcionalização das nanopartículas é a alteração de carga da superfície. Interações eletrostáticas podem promover a internalização celular das nanopartículas de forma mais eficaz que interações hidrofóbicas ou de van der Waals (DYKMAN *et al.*, 2014). Prova disso é que nanobastões de ouro cobertos com polímeros positivamente carregados são

internalizados mais eficientemente que aqueles negativamente carregados ou neutros (HAUCK *et al.*, 2008). Esse resultado deriva do fato de que a carga positiva favorece a adsorção à superfície celular que é negativamente carregada (CHO *et al.*, 2009).

1.5. Citotoxicidade dos Nanobastões de Ouro

O ouro é relativamente inerte, embora seja sabido que ele pode interagir com aminas primárias e grupos carboxila. Por isso, nanopartículas de ouro são consideradas ideais para aplicações biológicas. No entanto, para a síntese dessas AuNPs, são utilizadas diversas substâncias químicas que podem ser danosas aos sistemas biológicos. No caso dos AuNRs, o CTAB tem sido apontado como o agente responsável pela toxicidade, e não as nanopartículas em si (PISSUWAN *et al.*, 2008).

O CTAB é um surfactante catiônico com propriedades detergentes sobre biomembranas e proteínas. Sendo assim, ele se torna uma substância incompatível com aplicações biológicas. Entretanto, seu uso é indispensável, pois além de se ligar nas laterais das nanopartículas e direcionar seu crescimento em forma de bastão durante o processo de síntese, ele também impede que os AuNRs se agreguem entre si após a síntese. Este é o principal motivo pelo qual o CTAB não é totalmente removido ao término da síntese, embora a maior parte do surfactante livre em solução seja retirada por consecutivas etapas de centrifugação e lavagem (PISSUWAN *et al.*, 2008).

O efeito citotóxico do CTAB é evidenciado em muitos estudos. Connor e colaboradores (2005) mostraram que AuNPs contendo CTAB apresentaram níveis de citotoxicidade significantes e similares aos do CTAB sozinho. Mas após as AuNPs terem sido lavadas para remoção do excesso de CTAB (permanecendo apenas aquele ligado à superfície das nanopartículas), a citotoxicidade observada anteriormente não se repetiu. Com isso, os autores sugeriram que o CTAB presente na superfície das AuNPs não é tóxico. Entretanto, essa premissa foi colocada em xeque por outro trabalho (QIU *et al.*, 2010). Nesse estudo foi observado que quando as AuNPs interagem com proteínas do meio de cultura celular, ocorre a substituição do CTAB pelas

proteínas, deixando esse composto livre no meio. Além disso, quando as nanopartículas são internalizadas, elas podem sofrer a ação de enzimas lisossomais que terminam por liberar o restante do CTAB ligado. Por sua vez, o CTAB livre se torna capaz de induzir a morte celular.

Independentemente da forma como o CTAB se encontra, livre ou ligado à superfície de nanopartículas, ele é reconhecidamente uma substância tóxica. Contudo, ele não pode ser completamente removido sem que haja a substituição por um agente estabilizante pós-síntese (impedindo a agregação), e que para aplicações biológicas, seja biocompatível. Diante desse desafio, muitos estudos têm empregado diversas substâncias biocompatíveis, após a síntese dos nanobastões, em substituição ao CTAB. Entre elas estão o polietilenoglicol (PEG) e a fosfatidilcolina (PISSUWAN *et al.*, 2008; TAKAHASHI *et al.*, 2006). Além de impedir a agregação, esses ligantes podem diminuir a interação inespecífica das nanopartículas com membranas celulares e proteínas solúveis, aumentando o tempo de permanência na corrente sanguínea. Em razão disso, a dose tolerável para determinada molécula ligada às nanopartículas pode ser diferente daquela tolerável para a molécula sozinha (NIIDOMEA *et al.*, 2006; DREADEN *et al.*, 2012).

1.6. Aplicações Biomédicas dos Nanobastões de Ouro

1.6.1. Diagnóstico, Imagem Molecular e Terapia Fototermal

Os tecidos possuem, intrinsecamente, características que absorvem (hemoglobina, melanina, água) e espalham (membrana celular, núcleo, mitocôndria) a luz. Embora isso possibilite o contraste entre os tecidos, muitas vezes essas propriedades por si só não são suficientes ou específicas para o diagnóstico por imagem, e por isso, utilizam-se substâncias contrastantes (PISSUWAN *et al.*, 2008). As nanopartículas de ouro, por sua grande capacidade de absorver e espalhar a luz, são ideais para fins contrastantes. Sobretudo os AuNRs, que se destacam pela alta eficiência na absorção e espalhamento de luz em comparação com as nanoesferas de ouro (COPLAND

et al., 2004). Nesse cenário, a utilização de AuNRs funcionalizados com moléculas específicas contra um alvo pode ser uma excelente ferramenta diagnóstica.

Ha e colaboradores (2011) mostraram a possibilidade de se distinguir células normais de células expressando biomarcadores de inflamação vascular através da técnica de tomografia fotoacústica. Para isso, eles utilizaram AuNRs funcionalizados com anticorpos anti ICAM-1 (do inglês, *Intercellular Adhesion Molecule-1*) ou anti E-selectina. Ambas as moléculas são intensamente expressas em células endoteliais estimuladas por citocinas pró-inflamatórias. Essa funcionalização garante que grande parte dos nanobastões de ouro seja endereçada para os tecidos alvos desses anticorpos. A amplitude do sinal fotoacústico está diretamente relacionada com a eficiência na absorção óptica do tecido alvo. Dessa forma, os nanobastões aumentam o contraste tecidual devido à sua alta eficiência na absorção plasmônica de superfície. Nanopartículas funcionalizadas com anticorpos anti-mioglobina e troponina cardíaca, biomarcadores intensamente expressados no infarto do miocárdio, têm sido empregadas para quantificação dessas moléculas através da ressonância plasmônica de superfície das AuNPs. Essa plataforma diagnóstica multiplex se mostrou específica e sensível (TANG *et al.*, 2014).

Em pesquisas na área oncológica, os resultados têm sido promissores. Trabalhos empregando nanobastões de ouro funcionalizados com anticorpos monoclonais contra EGFR (do inglês, *Epidermal Growth Factor Receptor*) obtiveram êxito tanto na imagem quanto na terapia fototermal (HUANG *et al.*, 2006). Esse receptor é intensamente expresso em tumores malignos de células epiteliais. Por isso, AuNRs funcionalizados com anticorpos contra esse receptor permitem distinguir queratinócitos humanos (saudáveis) de células provenientes de carcinoma oral humano em microscopia de campo escuro. Ainda nesse estudo, os autores aproveitaram a especificidade celular das nanopartículas, decorrente da funcionalização, para tratamento fototermal. Após a incubação com os AuNRs, o tecido alvo foi irradiado com laser em comprimento de onda de 800 nm. Devido à capacidade dos nanobastões de ouro converterem a energia absorvida em calor, as células cancerosas (marcadas com AuNRs anti-EGFR) foram destruídas com apenas metade da energia necessária para matar as células normais. A utilização de terapia

fototermal através das AuNPs no tratamento de tumores de câncer subcutâneo de cólon em modelo murino mostrou que camundongos inoculados com as nanopartículas e tratados com laser apresentaram taxas de sobrevivência estatisticamente maiores que a dos controles - tratados com as AuNPs mas sem irradiação, irradiados sem terem sido inoculados com as nanopartículas e não tratados (GOODRICH *et al.*, 2010).

1.6.2. Entrega de Genes e Drogas

Visto que o uso de partículas virais como carreadores de genes pode trazer algum risco genético, citotóxico ou imunológico, a procura por vetores não virais é uma alternativa atraente. Para o carreamento de genes utilizando as AuNPs, as moléculas de DNA são ligadas na superfície dos AuNRs e liberadas quando irradiadas por laser NIR (do inglês, *Near-Infrared*). A irradiação promove a oscilação dos elétrons de superfície que interfere diretamente na ligação destes com as moléculas de DNA. Consequentemente, o DNA ligado é liberado, podendo ser transcrito e o RNAm traduzido (HUANG *et al.*, 2009; STONE *et al.*, 2011).

O uso do gene codificador de GFP (do inglês, *Green Fluorescence Protein*) ligado aos AuNRs também demonstra a abordagem de entrega de genes (CHEN *et al.*, 2006). Nesse estudo, células HeLa foram expostas ao bioconjugado, e na sequência, um grupo foi irradiado pelo laser NIR, liberando o DNA das nanopartículas, enquanto o outro grupo não sofreu a irradiação. Após a indução para expressão da proteína, esta foi observada apenas nas células irradiadas pelo laser.

Além de genes, a bioconjugação de drogas às AuNPs também tem sido amplamente estudada, principalmente no que tange sistemas de entrega inteligente. Este conceito é utilizado para carreadores em que a taxa de liberação da droga pode ser controlada. Wei e colaboradores (2008) mostraram que AuNRs funcionalizados com norvancomicina, antibiótico utilizado em infecções causadas por *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, podem ter a taxa de liberação da droga modulada pela irradiação NIR, destacando a versatilidade desse tipo nanopartícula. A aplicação de nanopartículas

multifuncionalizadas com uma droga citotóxica, com um ligante de receptores intensamente ou especificamente expressos em células cancerosas, e um marcador fluorescente, também tem sido explorada para tratamento e imageamento desta doença. A presença do ligante para o CD22, molécula intensamente expressada no linfoma de células B, aumenta a citotoxicidade significativamente das nanopartículas nessas células quando comparadas às nanopartículas não funcionalizadas (HUDLIKAR *et al.*, 2016).

1.6.3. Biossensores e Vacinas

Os AuNRs são muito adequados como biossensores porque o deslocamento do comprimento de onda de sua LSPR, sensível a qualquer ligação na superfície da nanopartícula, possibilita a detecção de moléculas em concentrações muito baixas. Bons resultados obtidos no uso de AuNRs como biossensor multiplex para câncer de mama destacam a eficiência dessa ferramenta (YU *et al.*, 2007). Neste estudo, três grupos de nanobastões, distinguíveis pelo tamanho, foram utilizados para detecção de três marcadores de superfície celular associados ao câncer de mama. Cada grupo de AuNR foi funcionalizado com um anticorpo específico contra um determinado marcador. Ou seja, foram detectados três marcadores diferentes para câncer de mama, sendo que cada grupo de nanobastão foi responsável pela detecção de um único tipo de marcador. Com isso, as alterações de LSPR de cada grupo, decorrentes da ligação dos anticorpos aos marcadores, permitiram identificar e diferenciar os tipos celulares cancerosos.

A possibilidade de se usar nanopartículas como vetores vacinais também constitui uma estratégia muito interessante. O tamanho e a forma das nanopartículas se assemelham ao de diversos vírus. Por isso, nanopartículas funcionalizadas com proteínas virais imunodominantes podem ser usadas como imunógeno, mimetizando, grosso modo, a infecção causada pela partícula viral. Estudos empregando essa técnica mostraram que células dendríticas humanas, após terem sido incubadas com AuNRs funcionalizados com a proteína de fusão do vírus RSV (do inglês, *Respiratory Syncytial Virus*), foram capazes de induzir a proliferação de células T em um grau maior que as

células dendríticas incubadas com o controle (STONE *et al.*, 2013). Nosso grupo de pesquisa desenvolveu uma plataforma vacinal com AuNRs funcionalizados covalentemente com a proteína E do *Dengue virus 3* (DENV3E). O soro dos camundongos imunizados com esta vacina apresenta níveis de resposta imune humoral e celular significativamente superiores ao grupo imunizado apenas com a proteína DENV3E, sendo esses resultados muito promissores para o desenvolvimento de novos estudos (VERSIANI, dissertação de mestrado, 2014).

Assim, as AuNPs se mostram muito versáteis considerando as várias áreas biomédicas em que podem ser empregadas. E esses estudos demonstram que as nanopartículas de ouro possuem um futuro promissor na área biológica.

2. Interação entre Nanopartículas de Ouro e Sistemas Biológicos

A grande maioria das aplicações biomédicas envolvendo nanopartículas tem como alvo o meio intracelular. E para que ele seja atingido, é necessário o entendimento de uma série de fatores que influenciam todo o processo, desde a inoculação, nos casos *in vivo*, até o destino intracelular (CHOU *et al.*, 2011).

Primeiramente, as nanopartículas podem interagir com várias moléculas do meio, principalmente com proteínas séricas, que podem alterar a carga de superfície da nanopartícula bem como o seu tamanho pelo acúmulo de moléculas ao seu redor, ou agregação entre as nanopartículas. Além disso, essas moléculas que interagem com a superfície das nanopartículas podem atuar como ligantes dos receptores de superfície celular, fazendo o papel de mediadores entre a nanopartícula e a célula, ou mesmo interferir na ligação caso as nanopartículas já estejam funcionalizadas com um ligante específico (CHOU *et al.*, 2011).

Uma vez dentro do organismo, as nanopartículas podem interagir com células e tecidos de forma extracelular ou, então, serem internalizadas pelas células-alvo, dependendo de sua funcionalidade. No último caso, esta internalização se dá por diferentes vias que dependem do tipo de interação da

nanopartícula com a superfície celular e do tamanho dessa nanopartícula. A interação pode ser através de receptores celulares, interações eletrostáticas ou hidrofóbicas (CHOU *et al.*, 2011). Quanto ao tamanho da nanopartícula, este não se limita apenas aquele tamanho determinado pelo material do qual a nanopartícula é feita, mas vai além, envolvendo também as moléculas do meio circundante que se ligam à sua superfície, aumentando o tamanho dessa nanopartícula. Portanto, esses dois fatores (tipo de interação e tamanho da nanopartícula) influenciam o tipo de via a ser utilizado pela célula para a internalização. Não obstante, trabalhos recentes têm demonstrado que as funcionalidades de uma AuNP, ou sua corona proteica, são essenciais para o sucesso da internalização de uma nanopartícula de maneira dependente de seu tamanho e também dos tipos celulares envolvidos (CHENG *et al.*, 2015).

Por fim, ao ultrapassar a membrana citoplasmática, a nanopartícula pode seguir para diversos destinos intracelulares (organelas) ou mesmo ser eliminada por exocitose (CHOU *et al.*, 2011). E esse desfecho, depende em parte, da via pela qual a nanopartícula é internalizada. Dessa forma, o entendimento dessa cadeia de processos que acontecem até que a nanopartícula atinja seu alvo é crucial para uma aplicação racional e bem sucedida dessa tecnologia *in vivo*.

2.1. Interação entre Nanopartículas de Ouro e Proteínas

As propriedades físico-químicas das AuNPs dependem do meio no qual elas estão inseridas. Algumas dessas propriedades são: carga de superfície, tamanho e estado de agregação. Quando as nanopartículas de ouro estão em contato com sistemas biológicos, seja *in vivo* ou *in vitro*, moléculas presentes nesse meio podem interagir com a superfície das AuNPs e alterar suas propriedades físico-químicas. Conseqüentemente, as interações das AuNPs com as células também podem ser afetadas (NEL *et al.*, 2009).

Dentre os diversos tipos de moléculas existentes nos sistemas biológicos, as proteínas são aquelas que mais influenciam as características físico-químicas das AuNPs. *In vivo*, as proteínas séricas são as mais frequentemente encontradas ligadas à superfície das nanopartículas. *In vitro*, a

principal fonte de proteínas é o soro utilizado para enriquecer os meios de cultura celular. Além dessas fontes, as biomoléculas secretadas pelas células em ambos os sistemas também constituem um potencial fator modificador das propriedades de superfície das AuNPs (NEL *et al.*, 2009).

A ligação entre as proteínas presentes no meio e a superfície das nanopartículas forma um halo proteico ao redor das nanopartículas denominado corona (NEL *et al.*, 2009). Quando as nanopartículas são introduzidas em fluídos biológicos, há a formação imediata de uma corona ao seu redor constituída de certos tipos de proteínas que são abundantes, porém, de baixa afinidade pela superfície das nanopartículas. Devido à baixa afinidade, essas proteínas são rapidamente substituídas por proteínas pouco abundantes, mas com alta afinidade pelas nanopartículas, permanecendo ligadas por horas. Por terem maior afinidade, essas proteínas formam uma camada interna no halo proteico chamada de *hard* corona. Já as proteínas de baixa afinidade compõem a camada externa denominada *soft* corona (MAHMOUDI *et al.*, 2011).

Entretanto, a corona sofre grande influência do dinamismo existente no ambiente extracelular. Este é diretamente condicionado pelas células já que estas depletam as proteínas presentes no meio e secretam outras ao longo do tempo. Conseqüentemente, as propriedades de superfície das nanopartículas que dependem do meio também se modificam. Albanese e colaboradores (2014) mostraram que alterações no tipo e na concentração de proteínas do meio de cultura, resultado do metabolismo celular, podem causar a agregação de nanoesferas de ouro (Fig. 6). Essa dinâmica na composição de biomoléculas do meio provoca variações dos tipos de proteínas associadas à superfície das nanopartículas. Os autores também observaram que moléculas de outra natureza, como íons e metabólitos celulares, são capazes de causar a agregação. Além disso, o condicionamento do meio pelas células pode aumentar a associação das nanopartículas com estas células e a quantidade de AuNPs internalizadas (Fig. 6).

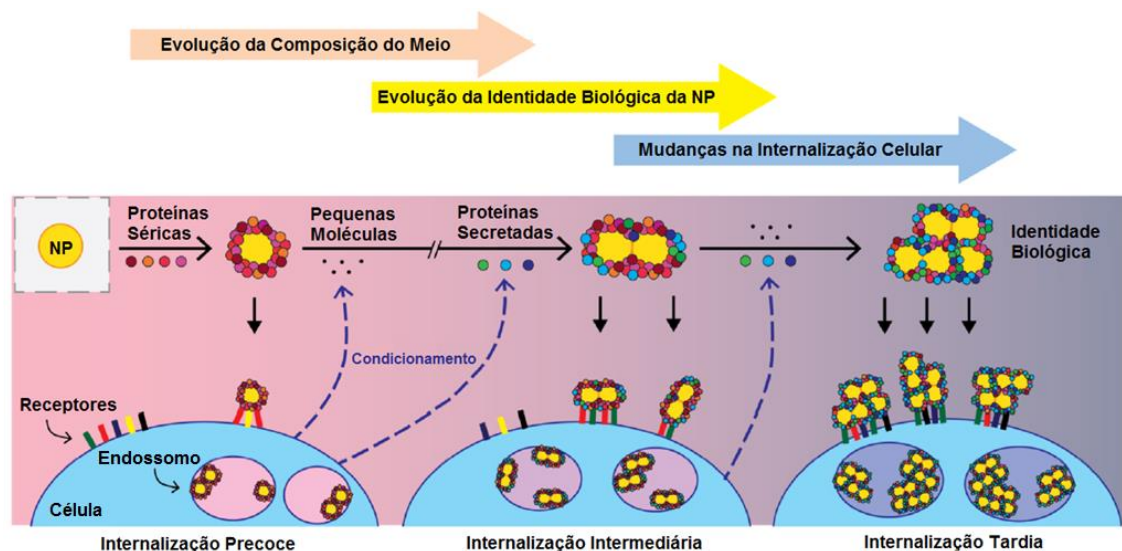


Figura 6. Evolução das nanopartículas de ouro no ambiente extracelular. Inicialmente, quando as nanopartículas são incubadas com células na presença de soro fetal bovino, as proteínas presentes no meio se ligam à superfície das nanopartículas e possibilitam a interação com determinados receptores celulares. Porém, no decorrer do tempo, o ambiente extracelular se modifica em função dos metabólitos secretados pelas células. E dessa forma, esses outros tipos de biomoléculas no meio também podem se ligar às nanopartículas e alterar o tipo de receptor da interação nanopartícula-célula e a quantidade de nanopartículas internalizadas. NP: nanopartícula. Adaptado de ALBANESE *et al.*, 2014.

A complexidade das interações existentes entre AuNPs, meio extracelular e células dificulta o estabelecimento de causas para todos esses fenômenos observados. Entretanto, vários estudos foram conduzidos na tentativa de explicá-los.

No que se refere à agregação das AuNPs, duas principais razões são apontadas: interação proteína-proteína ou desestabilização da superfície das nanopartículas (ALBANESE *et al.*, 2014). Ao serem colocadas em meio biológico, as nanopartículas são prontamente coberta por proteínas, formando a corona. Assim, as proteínas da corona de uma nanopartícula podem interagir e se associar às proteínas da corona de outras nanopartículas promovendo a agregação. A formação da corona também pode remover agentes estabilizantes da superfície das nanopartículas, necessários para garantir sua monodispersão em solução, o que acarreta a agregação das AuNPs.

O aumento no número de nanopartículas associadas e internalizadas pelas células também está relacionado à corona proteica (ALBANESE *et al.*, 2014). Uma vez ligadas à superfície das nanopartículas, essas proteínas podem atuar como ligantes de receptores celulares. Isso aumentaria a associação dessas AuNPs com as células em comparação às nanopartículas desprovidas da corona. Entretanto, outro estudo revelou que as proteínas

séricas, na verdade, diminuem a adsorção das AuNPs funcionalizadas com PEG em células fagocíticas e não fagocíticas (CHENG *et al.*, 2015). Além desse fato, as proteínas séricas também influenciam a via predominante de endocitose em cada tipo celular. Os agregados também possuem papel importante na associação das nanopartículas com as células, já que por serem maiores que as nanopartículas individuais, eles estão mais propícios a se ligarem aos receptores. Além disso, Dobrovolskaia e colaboradores (2009) mostraram que a formação da corona altera a carga de superfície das AuNPs. Dependendo da nova carga de superfície e da carga da região da membrana citoplasmática com que essa nanopartícula irá interagir, o resultado poderá ser a atração entre ambas. Isso também promoveria o aumento na associação das AuNPs com as células. O aumento dessa associação impacta diretamente no número de nanopartículas internalizadas, pois estando aderidas à membrana citoplasmática, o provável desfecho é o seu engolfamento. Porém, quando se considera células fagocíticas, existem diferentes vias pelas quais as nanopartículas podem penetrar. Essas vias dependem de uma série de fatores que vão desde o tamanho das nanopartículas até o tipo de interação (eletrostática, hidrofóbica, receptores) que estas fazem com a membrana citoplasmática. Por sua vez, a via de penetração definirá o destino dessas nanopartículas no interior da célula.

2.2 Vias de Penetração das Nanopartículas de Ouro nas Células

2.2.1 Mecanismos de Endocitose

A membrana citoplasmática é a estrutura celular que não somente separa o meio intracelular do extracelular como também regula a passagem de moléculas entre esses dois meios. Moléculas pequenas tais como aminoácidos e açúcares, e também íons, são transportadas através da membrana por bombas (formadas por proteínas transmembrana) ou canais. Por outro lado, macromoléculas que precisam seguir para o interior da célula são transportadas dentro de vesículas derivadas da membrana citoplasmática.

Esse processo recebe o nome genérico de endocitose. A endocitose acontece por diferentes mecanismos que são classificados em duas grandes categorias: fagocitose e pinocitose. A principal diferença entre elas é o tamanho das partículas internalizadas. A fagocitose se refere à endocitose de grandes partículas, como leveduras e bactérias, enquanto a pinocitose abrange a internalização de fluídos e solutos. Esses mecanismos, altamente regulados pelas células, cumprem a função de controlar processos como a apresentação de antígenos, homeostase e monitoramento do ambiente pelas células imunes (CONNER *et al.*, 2003).

A fagocitose é realizada por diferentes células, sendo os monócitos, os macrófagos e as células dendríticas os fagócitos profissionais. Elas são responsáveis por fagocitar e eliminar patógenos como bactérias e leveduras, *debris* celulares e gorduras depositadas em artérias. Este tipo de endocitose conta com a participação de receptores de superfície celular que, ao se associarem aos seus ligantes, desencadeiam inúmeras cascatas de sinalização. Elas resultam na polimerização do citoesqueleto de actina e na resposta pró-inflamatória em certos casos. Ao se polimerizar, a actina possibilita a extensão da membrana citoplasmática em direção ao meio extracelular e em torno da partícula ligada ao receptor (Fig. 7). Dessa forma, a célula consegue engolfar a partícula ligada à sua superfície e direcioná-la ao citoplasma dentro de vesículas denominadas fagossomos. A ativação das vias pró-inflamatórias acontece principalmente quando a partícula a ser fagocitada é um patógeno, garantindo assim que uma resposta imune seja montada para combater o invasor (CONNER *et al.*, 2003).

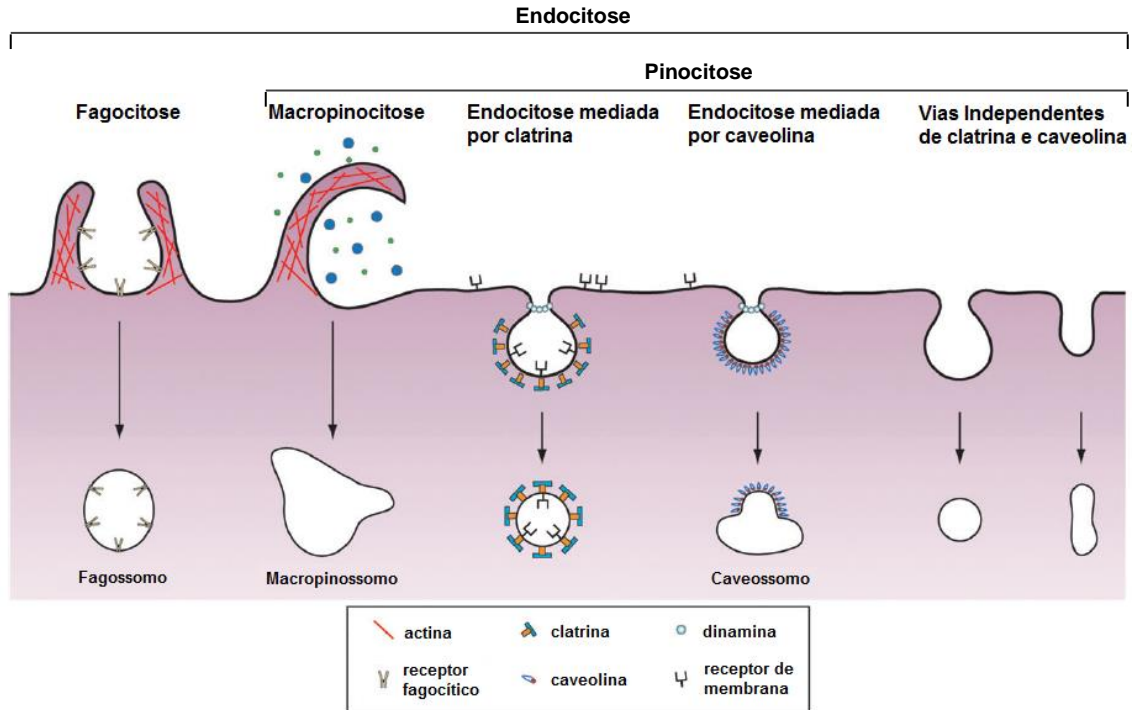


Figura 7. Vias de endocitose do conteúdo extracelular. A fagocitose e macropinocitose dependem da polimerização de actina para que a membrana citoplasmática se projete em direção ao meio extracelular e permita a internalização do conteúdo adsorvido ou próximo à superfície celular. A endocitose por clatrina ou caveolina requer a participação de proteínas homônimas que promovem a invaginação da membrana e formação das vesículas que são liberadas da superfície interna da membrana pela ação enzimática da dinamina. As vias de internalização independentes de clatrina e caveolina ainda estão pouco caracterizadas. Adaptado de CHOU *et al.*, 2011.

A pinocitose ocorre em todas as células nucleadas por 4 mecanismos diferentes: macropinocitose, endocitose mediada por clatrina, endocitose mediada por caveolina e endocitose independente de clatrina e caveolina (Fig. 7). O tipo de soluto e o receptor com o qual ele interage determinam o mecanismo de pinocitose a ser utilizado pela célula (CONNER *et al.*, 2003).

Na macropinocitose, assim como na fagocitose, a célula projeta a membrana citoplasmática em direção ao ambiente extracelular devido à polimerização da actina. No entanto, a forma como isso acontece é diferente. Neste tipo de endocitose, a protusão da membrana citoplasmática se curva, como se fosse uma onda, e se funde com a própria membrana gerando vesículas chamadas de macropinosomos (CONNER *et al.*, 2003) (Fig. 7). Além dessa protusão, a membrana citoplasmática pode se enruguar e trazer consigo todo conteúdo adjacente a essa região (DOHERTY *et al.*, 2009). Por executar esses tipos de movimentos, a macropinocitose traz grande volume do meio extracelular no interior dessas vesículas, podendo englobar partículas maiores que 1 μm (CONNER *et al.*, 2003). Essa via é dependente de colesterol

e pode ser estimulada pela ativação de receptores (DOHERTY *et al.*, 2009) ou por interações eletrostáticas e hidrofóbicas entre o material a ser endocitado e a membrana citoplasmática (CHOU *et al.*, 2011). Células dendríticas ativadas usam a macropinocitose para monitoramento do meio extracelular quanto à presença de antígenos ou mesmo de patógenos inteiros (MELLMAN *et al.*, 2001).

O mecanismo de endocitose mediada por caveolina é comum em células endoteliais. Acredita-se que sua principal função nessas células é o transporte de proteínas da corrente sanguínea para os tecidos. Mas esse mecanismo não é restrito apenas às células endoteliais, ele está presente em muitos outros tipos celulares. As regiões da membrana citoplasmática onde a endocitose via caveolina ocorre são demarcadas por microdomínios ricos em esfingolipídeos e colesterol. Após a associação do ligante ao seu receptor, inicia-se uma cascata de sinalização que leva à internalização do ligante. Basicamente, a proteína intracelular caveolina, que dá nome a esse mecanismo, se liga ao colesterol da membrana citoplasmática e se auto-associa formando uma camada sob a membrana. Dessa forma, a caveolina direciona a invaginação da membrana citoplasmática formando vesículas com diâmetro entre 50 e 60 nm (CONNER *et al.*, 2003).

A endocitose mediada por clatrina acontece constitutivamente em células de mamíferos e é responsável pela internalização de nutrientes como o LDL (do inglês, *Low Density Lipoprotein*) e o ferro (associado à transferrina) através de seus receptores (CONNER *et al.*, 2003). A internalização desses receptores é um marcador específico de endocitose via clatrina amplamente utilizado (DOHERTY *et al.*, 2009). Ela também participa da homeostase e sinalização celular por regular os níveis de moléculas transportadoras e receptores na superfície das células através da internalização destes. Ao se ligar ao receptor, a molécula a ser internalizada dispara a sinalização de endocitose que recruta diferentes proteínas citosólicas para a membrana citoplasmática, sendo a clatrina a principal delas. Essas proteínas formam uma camada sob a membrana que promove a invaginação da membrana e formação das vesículas de aproximadamente 120 nm. No entanto, essas vesículas ficam presas à membrana por um “pescoço” (Fig. 7) que na verdade é a continuação da membrana. Para que as vesículas sejam liberadas, é

necessária a participação da dinamina. Essa proteína se auto associa em torno do “pescoço” formando uma estrutura semelhante a um colar, e assim, promove a liberação da vesícula endocítica. A dinamina também exerce essa função na endocitose mediada por caveolina (CONNER *et al.*, 2003).

O mecanismo de endocitose independente de clatrina e caveolina requer composição lipídica específica como o colesterol (DOHERTY *et al.*, 2009). No entanto, pouco se sabe a seu respeito porque ele é descrito em termos negativos, ou seja, sua existência é percebida em estudos onde a endocitose via clatrina e caveolina é inibida e ainda se nota a internalização de certas moléculas (CONNER *et al.*, 2003) como hormônios de crescimento e IL-2 (Interleucina-2) (DOHERTY *et al.*, 2009).

2.2.2 Endocitose de Nanopartículas de Ouro

As nanopartículas de ouro, quando incubadas com células *in vitro* ou mesmo inoculadas *in vivo*, tendem a ser internalizadas pelas células. Essa questão é muito importante já que o destino intracelular do conteúdo internalizado depende da via de penetração na célula (CONNER *et al.*, 2003). E entender como essas AuNPs são endocitadas pode auxiliar na otimização de diversas aplicações.

Para que a internalização das AuNPs ocorra, é necessário primeiramente que as nanopartículas interajam com as células. Isso pode ser feito através da funcionalização das AuNPs com moléculas ligantes de receptores na membrana citoplasmática, o que garante especificidade de ligação e conseqüentemente o direcionamento contra um alvo. Mas também, as interações podem acontecer de forma inespecífica, por meio de interações eletrostáticas e hidrofóbicas entre as AuNPs e a membrana citoplasmática (CHOU *et al.*, 2011).

Uma vez que as AuNPs interagiram com a membrana citoplasmática, o próximo passo é que elas sejam endocitadas. E dentre as vias de endocitose já observadas para as AuNPs, as quatro principais são: fagocitose, macropinocitose, endocitose mediada por clatrina e caveolina (BARTNECK *et al.*, 2010; FRANÇA *et al.*, 2011). Além dessas vias, também se especula o

transporte direto das AuNPs através da membrana, sem o envolvimento de vesículas. Banerji e colaboradores (2007), usando lipossomos para mimetizar membranas biológicas, mostraram que é pouco provável o transporte passivo (não endocítico) das AuNPs. Por outro lado, AuNPs cobertas com ligante hidrofóbico regularmente intercalado com ligante aniônico (formando domínios de composição alternada) são capazes de penetrar passivamente a membrana citoplasmática sem causar ruptura da mesma (VERMA *et al.*, 2008).

Após serem endocitadas, as AuNPs contidas em vesículas podem seguir para diferentes destinos intracelulares como lisossomos, aparelho de Golgi e mitocôndrias ou ainda serem excretadas para o meio extracelular novamente (Fig. 8). Esse transporte de vesículas é altamente regulado pelas células. Ele conta com proteínas motoras (cinesina, dineína e miosina) que transportam as vesículas ao longo dos microtúbulos ou dos filamentos de actina. Essas vesículas, ao se formarem e se desprenderem da membrana citoplasmática, seguem para o endossomo precoce. Esse compartimento determina o destino subsequente das AuNPs e de qualquer molécula endocitada. A partir do endossomo precoce, as vesículas podem ser recicladas – direcionadas à membrana citoplasmática, fundindo-se a ela e liberando seu conteúdo no meio extracelular – ou amadurecerem e se tornarem lisossomos pela acidificação do lúmen e recrutamento de proteases (CHOU *et al.*, 2011). Portanto, entender como funciona a endocitose das AuNPs é fundamental para obter a resposta celular desejada.

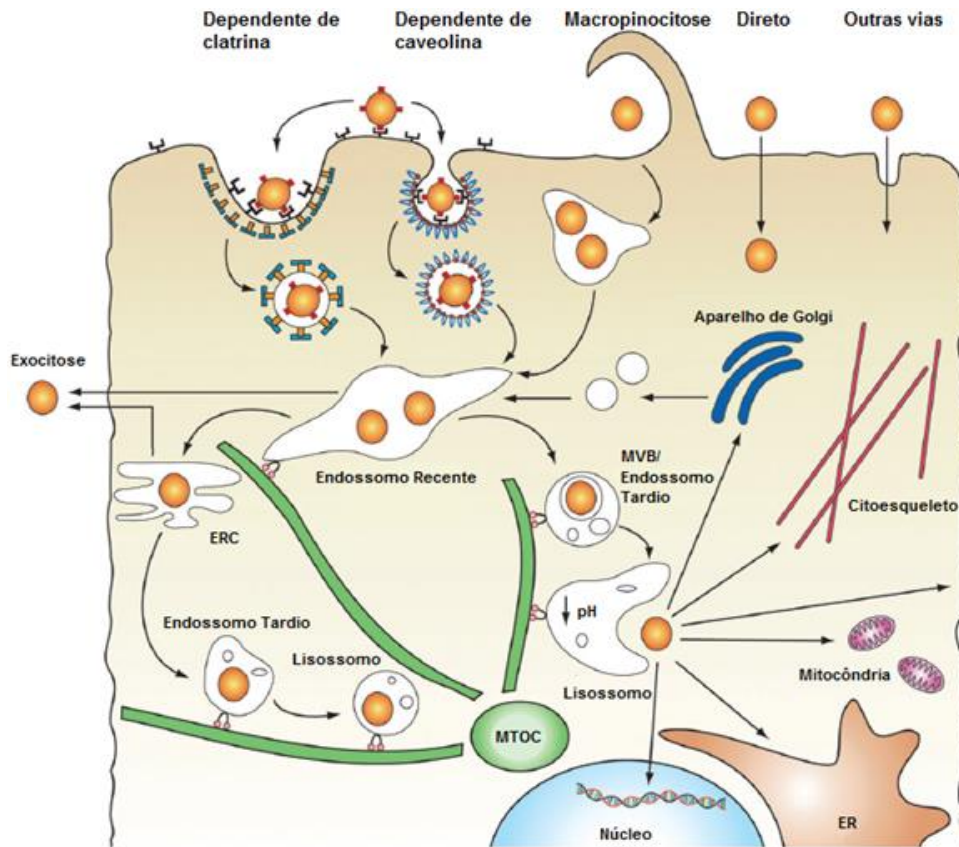


Figura 8. Transporte intracelular de nanopartículas de ouro. Dependendo da via de endocitose, a nanopartícula pode seguir diferentes destinos no meio intracelular como o retículo endoplasmático, o aparelho de Golgi, mitocôndrias, lisossomos e o núcleo, ou ainda sofrer exocitose. ERC: Compartimento Reciclador Endocítico; ER: Retículo Endoplasmático; MTOC: Centro Organizador de Microtúbulo; MVB: Corpos Multivesiculares. Adaptado de CHOU *et al.*, 2011.

Diversos estudos têm tentado compreender como as nanopartículas de ouro são internalizadas e quais aspectos, da própria partícula e do meio, afetam esse processo. Dentre esses aspectos, destacam-se a interação de proteínas do meio com as AuNPs e a funcionalização, que por modificar a superfície das nanopartículas, altera sua interação com as proteínas do meio e com as células. Por sua vez, a forma como as AuNPs interagem com as células influencia a via pela qual elas são endocitadas. De fato, Cheng e colaboradores (2015) demonstraram que a endocitose de AuNPs depende de uma complexa inter-relação que envolve a corona proteica da nanopartícula, seu tamanho e o tipo de célula-alvo.

Walkey e colaboradores (2012) avaliaram a internalização de AuNPs por macrófagos murinos J774A.1 quanto à funcionalização das nanopartículas e à interação destas com proteínas séricas humanas. Quando incubadas com soro humano, as AuNPs funcionalizadas com PEG (polietilenoglicol) têm uma

quantidade significativamente menor de proteínas adsorvidas em sua superfície em relação às nanopartículas não funcionalizadas. E nas AuNPs funcionalizadas, a quantidade de proteínas adsorvidas diminui à medida que a densidade de PEG aumenta. No que tange a internalização, a funcionalização das AuNPs com PEG reduz significativamente sua endocitose por macrófagos em comparação às nanopartículas não funcionalizadas. E essa redução se acentua conforme a densidade de PEG aumenta (Fig. 9). Essa diminuição na quantidade de nanopartículas internalizadas pós-funcionalização também foi observada para nanobastões de ouro (AuNRs) funcionalizados com PEO (polietileno-óxido) (BARTNECK *et al.*, 2010). Acredita-se que por diminuir a adsorção de proteínas séricas na superfície das AuNPs, a funcionalização impeça interações entre essas proteínas e os receptores celulares, e conseqüentemente, reduza a quantidade de nanopartículas endocitadas (MAHMOUDI *et al.*, 2011).

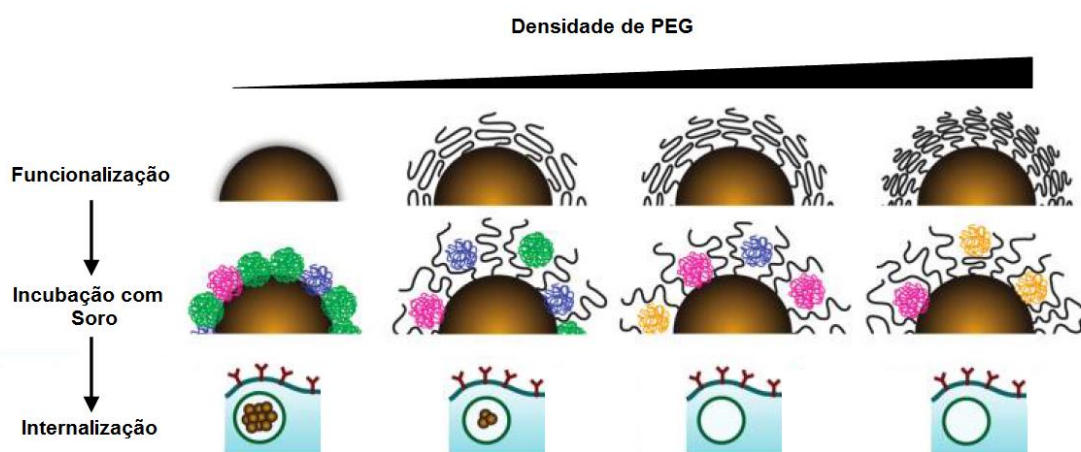


Figura 9. Influência da densidade de PEG (polietilenoglicol) na adsorção de proteínas séricas sobre a superfície das nanopartículas de ouro. Conforme a densidade de PEG funcionalizado na superfície das nanopartículas aumenta, a quantidade de proteínas séricas adsorvidas diminui. Como resultado, o número nanopartículas internalizadas também diminui. Adaptado de WALKEY *et al.*, 2012.

As interações entre as proteínas séricas e as células pode se dar através de receptores na superfície da membrana citoplasmática. E esses receptores podem ser dos mais variados tipos, como receptores para a porção Fc das imunoglobulinas, para manose e para proteínas do sistema complemento. Com o intuito de investigar o papel desses receptores na internalização de AuNPs, Bartneck e colaboradores (2010) utilizaram macrófagos primários humanos na presença de AuNRs funcionalizados com

PEO e de inibidores desses receptores. Primeiramente foi avaliada a participação da actina celular, cuja polimerização é essencial para o prolongamento da membrana citoplasmática tanto na fagocitose quanto na macropinocitose. Quando a polimerização da actina é inibida, há uma redução significativa na quantidade de AuNRs internalizados, ou seja, existe o envolvimento de uma ou ambas as vias de internalização. Os receptores para Fc, manose e sistema complemento, quando associados aos seus ligantes, desencadeiam a fagocitose pelas células. No entanto, quando esses receptores foram bloqueados, não houve diferença na quantidade de AuNRs internalizados em relação ao controle (células não tratadas com os inibidores). Essa constatação juntamente com observações de tamanho e morfologia das vesículas contendo AuNRs no citoplasma celular sugerem que a via de endocitose dessas nanopartículas seja a macropinocitose.

Na contramão desse achado estão estudos mostrando a participação de outros mecanismos na internalização das AuNPs, inclusive envolvendo receptores de superfície celular. Quando AuNPs não funcionalizadas são incubadas juntamente com macrófagos murinos J774A.1, observa-se as nanopartículas endocitadas dispostas paralelamente à membrana das vesículas, assumindo um padrão circular (Fig. 10a) (Yen *et al.*, 2009). Pelo fato das AuNPs não estarem funcionalizadas, os autores supõe que as interações dessas nanopartículas com proteínas séricas promovam a endocitose mediada por receptor, dado o arranjo circular dessas AuNPs no interior das vesículas. Caso esse processo não seja através de receptores, como é na macropinocitose, espera-se encontrar as nanopartículas dispersas dentro das vesículas (Fig. 10b). Adicionalmente, outros fatores como carga global e tamanho também influenciam de maneira determinante a internalização de AuNPs não-funcionalizadas (JIANG *et al.*, 2015). Os dados destes autores sugerem que partículas aniônicas ou de carga neutra perdem sua capacidade de internalização à medida que seu tamanho aumenta, ao passo que partículas catiônicas são mais internalizadas à medida que seu tamanho aumenta. Nesses casos, a internalização de AuNPs com cargas parece ocorrer através de endocitose, ao passo que a internalização de AuNPs sem carga ocorre por difusão passiva.

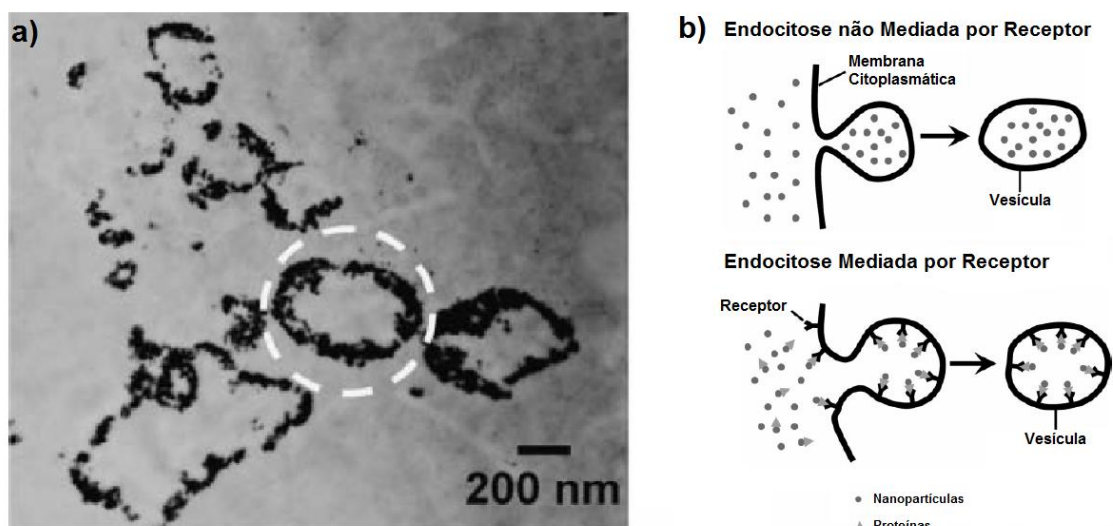


Figura 10. Endocitose de AuNPs mediada ou não por receptor. a) Imagem de microscopia eletrônica de transmissão de nanopartículas de ouro dispostas paralelamente à membrana das vesículas endocíticas. b) Desenho esquemático de como as nanopartículas são encontradas no interior das vesículas nos mecanismos de internalização mediados ou não por receptores. Adaptado de YEN *et al.*, 2009.

Embora o envolvimento de receptores de Fc, manose e complemento não tenham participação na internalização de AuNPs (BARTNECK *et al.*, 2010), outros receptores associados à fagocitose podem exercer esse papel, já que o envolvimento de receptores (Yen *et al.*, 2009) e do citoesqueleto de actina (BARTNECK *et al.*, 2010; GARCÍA *et al.*, 2013) é observado em diversos estudos. França e colaboradores (2011) identificaram o receptor scavenger A como o mediador da endocitose de AuNPs não funcionalizadas em macrófagos murinos RAW264.7. A internalização mediada por esse receptor é utilizada por macrófagos para eliminar células apoptóticas (ADEREM *et al.*, 1999). Além disso, França e colaboradores (2011) constataram que a polimerização de actina influencia significativamente a quantidade de AuNPs internalizadas. Como a actina é atuante na fagocitose e na macropinocitose, ambos os mecanismos são suspeitos de participar da endocitose das nanopartículas. Porém, quando utilizado um inibidor específico de macropinocitose, não há efeito sobre a quantidade de AuNPs internalizadas. Os autores também avaliaram e confirmaram a participação da endocitose mediada por clatrina e caveolina na internalização dessas nanopartículas. Quando feita uma série de combinações desses inibidores, não foi possível alcançar uma taxa de inibição próxima da total. Com isso, os autores concluem que diferentes vias de

endocitose estão envolvidas na internalização das AuNPs, e que o bloqueio de certas vias pode ativar outras rotas endocíticas para compensar a inibição.

Portanto, entender como as proteínas séricas e a funcionalização das AuNPs se relacionam com as diferentes vias de internalização é de vital importância para o emprego desse tipo de nanotecnologia de forma eficiente.

3. O vírus da Dengue

O vírus da dengue pertence à família *Flaviviridae* e ao gênero *Flavivirus*. Seu genoma é uma fita única de RNA com polaridade positiva. A partícula viral é envelopada e tem o tamanho aproximado de 50 nm. Sua estrutura é composta de três proteínas: a proteína C que constitui o nucleocapsídeo da partícula viral; a proteína de envelope prM que é processada no *trans* Golgi em sua forma madura, M, antes do vírus ser liberado; e a proteína E também inserida no envelope viral. Acredita-se que a função da proteína prM/M é de proteger a proteína E de uma mudança conformacional induzida por baixo pH, já que isso levaria à fusão (processo de união entre o envelope viral e a membrana endossomal que resulta na liberação do nucleocapsídeo) durante a exocitose da partícula viral (CLYDE *et al.*, 2006; STIASNY *et al.*, 2006).

3.1 Estrutura e Função da Proteína E

A proteína E é muito versátil em termos de função, pois ela é responsável tanto pela adsorção do vírus à célula quanto à fusão entre o envelope viral e a membrana endossomal para liberação do nucleocapsídeo no citoplasma celular. Ela também é o principal alvo da imunidade humoral (CLYDE *et al.*, 2006).

Essa proteína é um homodímero onde cada subunidade monomérica está orientada antiparalelamente à outra. Cada monômero é formado por três domínios distintos: DI, DII e DIII (Fig. 11). O DI é o domínio central, estando flanqueado pelos outros dois domínios. O domínio II, localizado em uma das extremidades do monômero, possui a região de dimerização e o peptídeo de fusão. E o DIII tem a forma de uma imunoglobulina, sendo a região responsável

pela ligação ao receptor celular. Quando submetida a baixo pH, como o encontrado em endossomos tardios, a proteína E altera sua conformação passando a formar trímeros. Essa modificação também expõe o peptídeo de fusão, até então protegido pelos domínios I e III para evitar a interação precoce, e assim medeia a fusão endossomal (CLYDE *et al.*, 2006; STIASNY *et al.*, 2006).

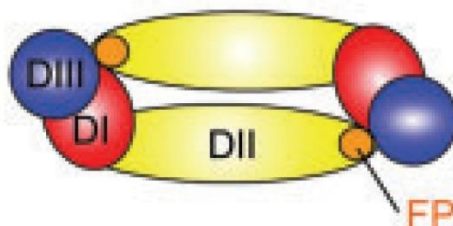


Figura 11. Estrutura da proteína E dimerizada. DI: domínio I; DII: domínio II; DIII: domínio III; FP: peptídeo de fusão. Adaptado de STIASNY *et al.*, 2006.

3.2 Resposta Imunológica frente à Imunização com o Protótipo Vacinal baseado em Nanobastões de Ouro Funcionalizados com a Proteína E

Visto que a proteína E é o principal alvo da imunidade humoral (CLYDE *et al.*, 2006) e que as AuNPs têm sido empregadas como carreadoras vacinais (STONE *et al.*, 2013), nosso grupo de pesquisa desenvolveu uma plataforma vacinal baseada em AuNRs funcionalizados covalentemente com a proteína E do *Dengue vírus 3* (DENV3E). Essa proteína, expressa em sistema procarioto, possui 80% do tamanho original devido ao fato de sua porção transmembrana ser truncada (VERSIANI, dissertação de mestrado, 2014).

A imunização de camundongos mostrou que o grupo inoculado com o protótipo vacinal produz níveis de IgG total e anticorpos neutralizantes significativamente maiores que o grupo vacinado apenas com a proteína E (Fig. 12a e b) (VERSIANI, dissertação de mestrado, 2014). Além disso, os níveis de IFN- γ (interferon- γ) são significativamente maiores no grupo imunizado com os AuNRs conjugado à DENV3E em relação aos demais grupos (Fig. 12c). De forma geral, esses resultados são muito promissores já que o IFN- γ é

considerado o principal contribuinte no sucesso relativo de protótipos vacinais para dengue (Zuest *et al.*, 2015), e vacinas induzindo conjuntamente a resposta celular e humoral são sugeridas como mais eficientes que vacinas baseadas apenas na produção de anticorpos (Zellweger *et al.*, 2013).

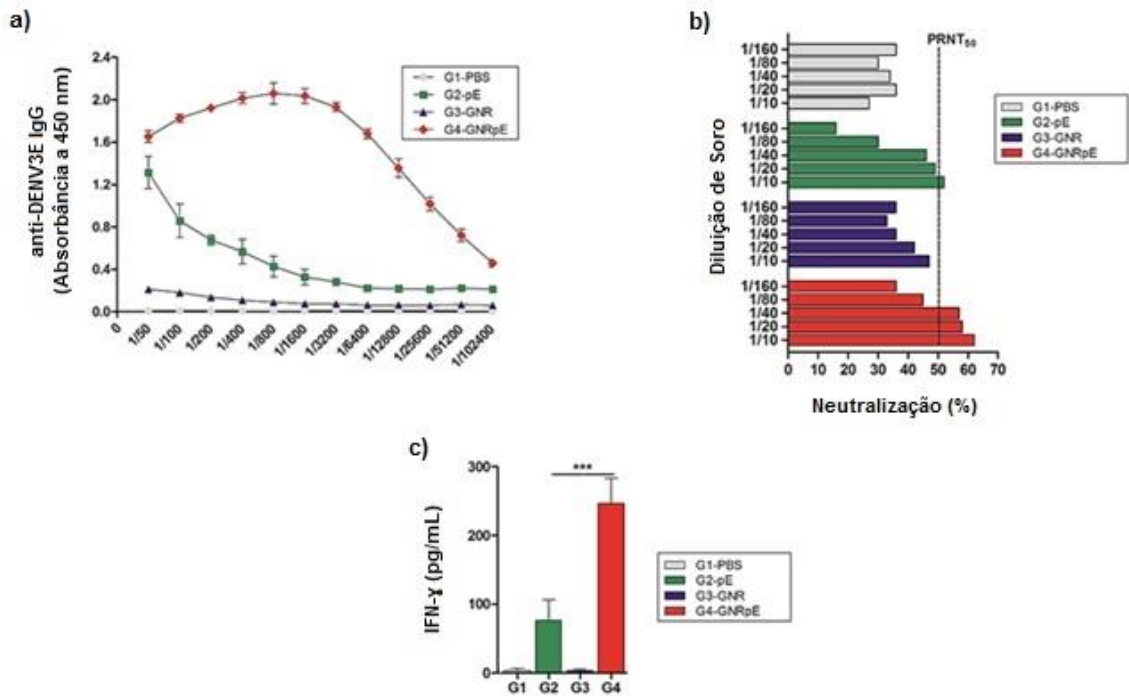


Figura 12. Indução de resposta humoral e celular em camundongos imunizados com os nanobastões de ouro funcionalizados com a proteína DENV3E. Os níveis de IgG total (a), anticorpos neutralizantes (b) e IFN- γ (c) são maiores no grupo imunizado com o protótipo vacinal (G4-GNRpE) em relação aos demais grupos. G1-PBS: camundongos imunizados com PBS; G2-pE: camundongos imunizados com a proteína DENV3E; G3-GNR: camundongos imunizados com os nanobastões de ouro; G4-GNRpE: camundongos imunizados com os nanobastões de ouro funcionalizados com a proteína DENV3E; PRNT₅₀: teste de neutralização de redução de placa (do inglês, *Plaque Reduction Neutralization Test*). Adaptado de VERSIANI, dissertação de mestrado, 2014.

Portanto, entender como essa ferramenta vacinal interage com o ambiente biológico e como as células do sistema imune, em particular os macrófagos, internalizam este bioconjugado, constitui um passo importante na direção do uso dessa tecnologia na aplicação vacinal.

II – Justificativa

As nanopartículas de ouro apresentam propriedades ópticas que variam conforme o tamanho e a morfologia das nanopartículas. Dentre essas nanopartículas de ouro estão os nanobastões, que apresentam propriedades ópticas muito úteis em métodos terapêuticos e diagnósticos. E para essas aplicações, os nanobastões estão geralmente funcionalizados.

O processo de funcionalização permite o endereçamento das nanopartículas a alvos específicos e é fundamental nas aplicações biomédicas como diagnóstico, imagem molecular, terapia fototermal, entrega de genes e drogas, biossensores e vacinas.

A grande maioria das aplicações biomédicas envolvendo nanopartículas tem como alvo o meio intracelular e as partículas podem ser internalizadas por diferentes vias reguladas pelas células. Uma vez no interior das células, as nanopartículas podem seguir para os lisossomos, aparelho de Golgi, mitocôndrias, ou mesmo serem excretadas novamente para o meio extracelular. Fatores como funcionalização, interação com proteínas séricas e formação de agregados interferem na forma como elas são internalizadas.

As nanopartículas de ouro em si não exibem efeitos citotóxicos, mas estes podem ser causados por agentes estabilizantes – em particular o CTAB – utilizados para sintetizar e impedir a agregação das nanopartículas.

Tendo em vista o advento do uso de nanopartículas na área biomédica e a grande aplicabilidade de nanobastões de ouro em métodos terapêuticos e diagnósticos, torna-se extremamente importante e necessário saber como as interações desses nanocompostos com sistemas biológicos acontecem, principalmente com as células do sistema imune que formam a linha de defesa primária. Estudos desta natureza são extremamente pertinentes em vista das inúmeras lacunas ainda existentes em relação a essas interações, e particularmente diante da escassez de dados e informações relativas aos estudos de interação entre nanobastões de ouro com finalidade vacinal e o sistema imune. Assim, diante do exposto, propomos analisar os possíveis mecanismos utilizados por macrófagos murinos para internalizar nanobastões de ouro funcionalizados ou não com a proteína DENV3E, e a participação das proteínas séricas nesses processos.

III – Objetivos

1. Objetivo Geral

- Avaliar o possível envolvimento das principais vias de internalização dos nanobastões de ouro funcionalizados com a proteína DENV3E em macrófagos murinos.

2. Objetivos Específicos

- Funcionalizar nanobastões de ouro com a proteína E Dengue do sorotipo 3.
- Analisar as vias de internalização dos nanobastões de ouro funcionalizados ou não com a proteína DENV3E em macrófagos através do bloqueio farmacológico de vias específicas, a saber:
 - Fagocitose;
 - Macropinocitose;
 - Endocitose mediada por Clatrina;
 - Endocitose mediada por Caveolina;
- Analisar possíveis interações de proteínas não específicas, solúveis, com os nanobastões de ouro e como essas proteínas influenciam as vias de internalização.

IV – Metodologia

1. Nanobastões de Ouro

1.1. Obtenção dos Nanobastões de Ouro

Os nanobastões de ouro (AuNRs) foram adquiridos comercialmente da empresa Nanopartz. Eles possuem 10 nm de diâmetro por 38 nm de comprimento e estão na concentração de $7,4 \times 10^{11}$ nanopartículas/mL (0,039 mg/mL). Essas e as demais especificações estão contidas no anexo I. As nanopartículas também foram testadas pela própria empresa para a presença de endotoxinas e microrganismos. Os resultados de ambos os testes foram negativos (anexo II e III).

1.2. Funcionalização dos Nanobastões de Ouro

Os nanobastões, antes de terem sido adicionados a uma solução contendo a proteína DENV3E, produzida de forma heteróloga em vetor procarioto (gerada pela aluna de doutorado Alice de Freitas Versiani do Laboratório de Virologia Básica e Aplicada da UFMG, Belo Horizonte, Brasil), foram previamente preparados para que a ligação acontecesse de forma covalente. Para isso, os AuNRs foram tratados em duas etapas: primeiramente eles foram associados ao ácido lipóico, que possui uma extremidade livre com um grupamento carboxila e outra extremidade composta por dois grupos tiol (Fig. 13b). O grupo tiol se adere ao ouro de forma estável, formando uma ligação forte, enquanto o grupo carboxila permanece disponível para um segundo passo que consiste em um tratamento intermediário que permite a ligação covalente com a proteína (Fig. 13a).

1.2.1. Ligação ao Ácido Lipóico

Como mencionado acima, a ligação do ácido lipóico às nanopartículas de ouro permite a interação destas com moléculas biológicas. Para realizar a ligação, 500 μ L de AuNRs foram incubados com 15 μ L de ácido lipóico (20

mM) por 30 min a 50°C sob ultrassonicação. A ultrassonicação tem a função de desestabilizar o CTAB associado à superfície das nanopartículas para posterior ligação do ácido lipóico. Após essa etapa, os AuNRs foram transferidos para um banho térmico de 30°C por 3 h, ainda sob ultrassonicação, para ligação do ácido lipóico. A ligação entre os tióis livres do ácido lipóico e a superfície do ouro ocorre espontaneamente, sem a necessidade da adição de outros reagentes químicos.

1.2.2. Ligação aos Reagentes Intermediários e Reação de Substituição pela Proteína

A funcionalização, ou seja, a ligação entre o radical carboxila do ácido lipóico e os radicais amina da proteína DENV3E, foi realizada através da reação de amidação ativada por diimida (JIANG *et al.*, 2004). Nesse processo, utiliza-se o cloridrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDAC) (Fig. 13b) para ativar os grupamentos carboxila do ácido lipóico, formando um intermediário reativo (Fig. 13a). Porém, esse intermediário é instável em solução aquosa. A N-hidroxisuccinimida (NHS) (Fig. 13b), quando adicionada à solução, forma um éster ativo mais estável. Ao ser adicionada, a proteína substitui o éster se ligando covalentemente ao ácido lipóico através de seus grupamentos amina.

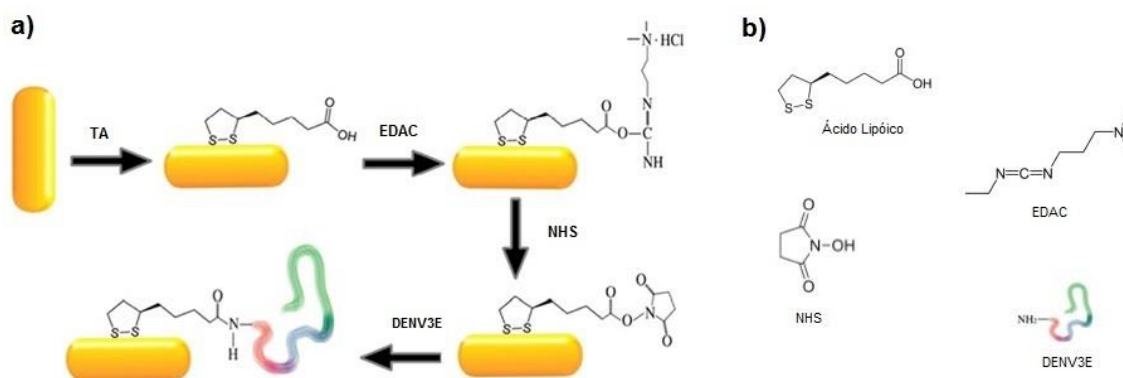


Figura 13. Desenho esquemático do processo de funcionalização. a) Os nanobastões de ouro são primariamente ligados ao ácido lipóico pelo grupo tiol. Posteriormente os reagentes EDAC e NHS são inseridos para estabilizar a ligação, permitindo uma reação de substituição quando a proteína é adicionada à solução. b) Estrutura molecular dos reagentes utilizados na funcionalização. TA: ácido lipóico; DENV3E: proteína E do *Dengue vírus 3*; EDAC: cloridrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida; NHS: N-hidroxisuccinimida. Adaptado de VERSIANI, dissertação de mestrado, 2014.

Após os AuNRs terem sido funcionalizados com o ácido lipóico, eles foram centrifugados a 5600 g durante 10 min a 4°C para retirada do sobrenadante contendo as moléculas que não se ligaram às partículas. Na sequência, os nanobastões foram redispersos em água bidestilada e foram adicionados 10 µL da solução contendo EDAC (10^{-4} mM) e NHS (10^{-4} mM). Essa mistura foi incubada por 30 min em banho de gelo sob sonicação. Essa etapa foi seguida da adição da proteína DENV3E que também foi incubada em gelo sob ultrassonicação por 1 h. A proteína foi adicionada em diferentes quantidades (0,7; 1,4; 2,1; 2,8; 3,5; 5,6; 7,0; 10,5; 14,0 µg) para verificar o ponto de saturação de ligação aos nanobastões.

1.3. Verificação de Eficiência da Funcionalização

As ligações na superfície das nanopartículas modificam sua ressonância plasmônica de superfície quando excitadas por determinado comprimento de onda. Isso se reflete no deslocamento da curva de ressonância (*“shift”*) nos gráficos. Essas alterações foram confirmadas utilizando um leitor de microplacas Varioskan™ Flash Multimode Reader, sob a faixa de excitação que variou de 400 a 950 nm.

2. Interações entre Nanobastões de Ouro e Sistemas Biológicos

2.1 Avaliação das Vias de Internalização dos Nanobastões de Ouro por Macrófagos Murinos

2.1.1 Obtenção de Macrófagos Murinos Derivados de Medula Óssea

As células precursoras de macrófagos foram obtidas da medula óssea de camundongos C57BL/6 (8 semanas de idade, peso aproximado de 20 g, Belo Horizonte, Brasil). A utilização dos animais foi aprovada pelo Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA) sob o número de protocolo 147/2013.

Os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e os fêmures e tíbias foram cuidadosamente extraídos e deixados em etanol 70% por 1 min. Posteriormente, os ossos foram adicionados a um tubo de polipropileno contendo PBS 1X (do inglês, *Phosphate-Buffered Saline*) estéril. Utilizando-se meio RPMI 1640 (do inglês, *Roswell Park Memorial Institute*, HyClone, LGC Biotecnologia) e uma seringa com agulha, as células da medula óssea foram removidas e transferidas para um tubo de polipropileno estéril.

Para a diferenciação em macrófagos, as células da medula óssea foram suspensas em 10 mL de meio RPMI suplementado com 20% SFB (Soro Fetal Bovino), 2 mM de glutamina, 100 unidades/mL de penicilina e estreptomicina, e 30% de sobrenadante de cultura de células L929. Esse sobrenadante foi obtido incubando-se as células L929 por 10 dias a 37°C sob 5% de CO₂ em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado com 10% SFB. Após esse período, o sobrenadante foi coletado, centrifugado a 890 x g por 5 min e filtrado em filtro de 0,45 µm. Esse sobrenadante contém quantidade significativa do fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF, do inglês, *Granulocyte Macrophage – Colony Stimulating Factor*) que é um fator de crescimento essencial na diferenciação de células progenitoras em macrófagos. As suspensões de células foram colocadas em placas de Petri e incubadas a 37°C sob 5% de CO₂ por 7 dias, sendo que no

quarto dia o meio foi removido e 10 mL de meio fresco com os mesmos constituintes foi adicionado. No sétimo dia de cultura, o sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas com 5 mL de PBS 1X para eliminar aquelas não aderidas.

As células aderidas na placa, já diferenciadas em macrófagos derivados da medula óssea (BMDM, do inglês, *Bone Marrow Derived Macrophages*), foram removidas com EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético, do inglês, *Ethylenediamine Tetraacetic Acid*). Para isso, 5 mL de EDTA (10 mM) foram adicionados à cultura seguida de incubação em gelo por 10 min. As células foram transferidas para um tubo de polipropileno estéril. Os BMDMs foram centrifugados a 890 x g por 5 min e suspensos em 5 mL de meio RPMI suplementado com 5% de SFB, 2 mM de glutamina, 100 unidades/mL de penicilina e estreptomicina, e 10% de sobrenadante de cultura de células L929. As células foram contadas, plaqueadas e incubadas a 37°C sob 5% de CO₂ por 24 h para uso posterior.

2.1.2 Estabelecimento da Concentração de Células

O MTT (Método de Redução do Tetrazólio), muito utilizado para avaliar a viabilidade celular, baseia-se na atividade das enzimas mitocondriais. Em células viáveis, essas enzimas reduzem o tetrazólio (coloração amarela) em sua forma insolúvel (coloração roxa), formando os chamados cristais de formazan. Nas células cuja viabilidade está afetada, a coloração roxa tende a ser menos intensa, podendo permanecer amarela no caso do tetrazólio não ser metabolizado.

As células utilizadas neste trabalho (BMDM) foram avaliadas pelo teste de MTT quanto a sua concentração (número de células/área) na presença ou ausência de SFB. Como o trabalho teve o intuito de avaliar os processos de forma cinética, foi preciso checar se as células se mantinham viáveis nas condições experimentais pretendidas.

Para este experimento, as células foram plaqueadas nas quantidades de 2×10^4 , 4×10^4 , 6×10^4 , 7×10^4 e 8×10^4 células por poço em placas de 96 poços (100 µL/poço) contendo meio RPMI suplementado com 2 mM de glutamina,

100 unidades/mL de penicilina e estreptomicina. A suplementação com SFB (5%) e sobrenadante da cultura de células L929 (10%), ambos contendo proteínas séricas, foi testada como variável experimental, estando presente (RPMI 05/10) ou ausente (RPMI 0). Cada condição experimental, ou seja, cada quantidade de células mais a presença ou ausência de proteínas séricas, foi avaliada em quadruplicata nos tempos de 0, 5, 24 e 48 h.

As células foram plaqueadas, em RPMI 05/10, e incubadas *overnight* a 37°C com 5% de CO₂. Após esse período, o meio foi removido e as células foram lavadas uma vez com PBS 1X. Para a placa referente ao tempo de 0 h, 100 µL de RPMI 05/10 ou RPMI 0 foram adicionados aos respectivos poços juntamente com 40 µL da solução de MTT (5 mg/mL), e a placa foi reincubada em estufa por mais 4 h, ao abrigo da luz. Para as placas de 5, 24 e 48 h, após a lavagem com PBS, foram adicionados 100 µL de RPMI 0 e as células foram reincubadas por 1 h, mimetizando o pré-tratamento com o inibidor específico de vias endocíticas. Na sequência, o meio foi removido, as células foram lavadas uma vez com PBS 1X e depois foram adicionados 100 µL de RPMI 05/10 ou RPMI 0 aos respectivos poços. As placas foram novamente reincubadas, por mais 4 h para o tempo total da placa de 5 h, por 23 h para a placa de 24 h e por 47 h para a placa de 48 h. No final de cada tempo foram adicionados 40 µL da solução de MTT (5 mg/mL), e cada placa foi incubada em estufa por mais 4 h, ao abrigo da luz.

Após a incubação, 120 µL do sobrenadante foram retirados de cada poço e a mesma quantidade de isopropanol acidificado foi adicionada. Os cristais de formazan foram homogeneizados e as placas foram lidas sob o comprimento de onda de 595 nm em leitor de microplacas Multiskan Spectrum (Thermo Scientific).

2.1.3 Estabelecimento da Concentração de Nanopartículas, Inibidores de Endocitose, do Diluente e da Citotoxicidade do CTAB

As concentrações de inibidores, diluente e nanopartículas utilizadas nos experimentos foram estabelecidas com base no teste de MTT a fim de

encontrar a concentração ideal que não compromettesse a viabilidade celular no tempo avaliado. A citotoxicidade do CTAB também foi avaliada por esse método.

Os testes foram realizados com diferentes concentrações dos AuNRs puros e funcionalizados com a proteína E, do diluente (dimetilsulfóxido, DMSO) e dos inibidores de endocitose (Tabela 1). Também foram feitos os controles de célula e de morte (Triton X-100).

Tabela 1. Inibidores de Endocitose.

Inibidor	Via Endocítica Alvo	Referência
<i>Cytochalasin D</i>	Fagocitose/Macropinocitose	GARCÍA <i>et al.</i> , 2013
<i>5-(N,N-dimethyl) amiloride hydrochloride</i>	Macropinocitose	FRANÇA <i>et al.</i> , 2011
<i>Dynasore hydrate</i>	Endocitose mediada por Clatrina	MACIA <i>et al.</i> , 2006
<i>Filipin III</i>	Endocitose mediada por Caveolina	ROTHEN-RUTISHAUSER <i>et al.</i> , 2013

As células foram plaqueadas na densidade de 6×10^4 células/poço em placas de 96 poços contendo 100 μL de meio RPMI 05/10 por poço e incubadas *overnight* a 37°C com 5% de CO_2 . Após esse período, o meio foi removido, as células foram lavadas uma vez com PBS 1X e os experimentos foram realizados conforme descrito abaixo.

Para os testes das concentrações de DMSO, foram avaliadas diluições variando de 0,1% a 3%. Para o controle de células foi adicionado apenas meio e para o controle de morte foi utilizado Triton X-100 (2,5%). Primeiramente, essas diluições foram feitas em 100 μL de RPMI 0 e incubadas por 1 h a 37°C com 5% de CO_2 , mimetizando o pré-tratamento com os inibidores. Após esse tempo, o meio foi removido e as células foram lavadas uma vez com PBS 1X. As mesmas diluições foram feitas em 200 μL de RPMI 05/10 ou RPMI 0, respectivamente, a cada condição avaliada (presença ou ausência de proteínas séricas), e a placa foi reincubada por mais 4 h. Terminada essa incubação, foram adicionados 40 μL da solução de MTT (5 mg/mL) e a placa permaneceu em estufa por mais 4 h, ao abrigo da luz. Ao final desse processo, 120 μL do sobrenadante foram retirados de cada poço e a mesma quantidade de isopropanol acidificado foi adicionada. Os cristais de formazan foram

homogeneizados e as placas foram lidas sob o comprimento de onda de 595 nm em leitor de microplacas Multiskan Spectrum (Thermo Scientific).

O mesmo procedimento descrito acima foi feito para o estabelecimento das concentrações de inibidores e dos AuNRs. Para os inibidores, as concentrações variaram de 1 a 20 μM para *cytochalasin D* (FRANÇA *et al.*, 2011; BARTNECK *et al.*, 2010), de 1 a 100 μM para 5-(*N,N*-dimethyl) amiloride hydrochloride (FRANÇA *et al.*, 2011; HUSSAIN *et al.*, 2011), de 40 a 200 μM para *dynasore hydrate* (NAGASAWA *et al.*, 2014) e de 1 a 10 $\mu\text{g/mL}$ para *filipin III* (NAGASAWA *et al.*, 2014). Para os AuNRs, foram feitas diluições seriadas de 10^0 até 10^6 em meio RPMI. A concentração final das nanopartículas em cada diluição foi calculada com base na concentração inicial informada pelo fabricante. Concomitante às diluições das AuNPs, foram feitas diluições seriadas correspondentes de CTAB partindo da concentração inicial de 3 mM, equivalente à encontrada na diluição inicial de 10^0 nanopartículas (Anexo I).

2.1.4 Avaliação das Vias de Internalização através de Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

As vias de internalização foram estudadas utilizando-se TEM em um experimento inicial de pequena escala, minimizando o número de variáveis. Neste experimento foi testado apenas um dos inibidores, a *cytochalasin D* (inibidor de fagocitose), na concentração de 1 μM em meio contendo proteínas séricas (RPMI 05/10). Os demais inibidores e a ausência de proteínas séricas não foram avaliados neste momento, bem como a funcionalização dos AuNRs com a proteína DENV3E. Apenas foram utilizados os nanobastões puros.

Para o experimento, placas de 6 poços contendo $1,8 \times 10^6$ células (BMDM) por poço foram incubadas a 37°C sob 5% de CO_2 *overnight* para aderência celular. Na sequência, o meio foi removido, as células foram lavadas uma vez com PBS 1X e foi adicionado o inibidor *cytochalasin D* (1 μM) diluído em RPMI 0 para a condição de inibição da via de fagocitose, e apenas RPMI 0 como controle. As células permaneceram incubadas por 1 h a 37°C sob 5% de CO_2 . Em seguida o meio foi removido, as células foram lavadas uma vez com PBS 1X e foram adicionados 30 μL de AuNR puro ($2,22 \times 10^{10}$ partículas)

diluídos em RPMI 05/10 juntamente com a *cytochalasin D* (1 μ M) para a condição de inibição da fagocitose, e 30 μ L de AuNR puro diluído em RPMI 05/10 para a não inibição da via. As células foram incubadas por mais 1 h. As quantidades de células, inibidor e nanopartículas foram escolhidas de acordo com os testes de viabilidade celular feitos previamente.

Por fim, o meio foi aspirado, as células foram lavadas novamente com PBS 1X para remoção dos AuNRs não endocitados e 1 mL de solução fosfato (0,1 M) foi adicionado em cada poço para a dissociação das células. Para cada condição, inibição ou não da fagocitose, foram feitas 6 replicatas (poços) que foram somadas após serem transferidas para um tubo de polipropileno. As células foram centrifugadas, o sobrenadante foi descartado, 1 mL de solução fosfato foi adicionada e a centrifugação foi repetida. Após essa última lavagem, o sobrenadante foi descartado e 4 mL de glutaraldeído (2,5%) foram adicionados, seguido de incubação por 1 h em temperatura ambiente. As células foram centrifugadas, a solução fixadora foi retirada e 1 mL de solução fosfato foi adicionado. Novamente a células foram centrifugadas para sedimentação do *pellet* e as amostras foram levadas ao Centro de Microscopia da UFMG para inclusão da amostra em parafina, microtomia e contrastação. As amostras foram pós-fixadas com 1% de tetróxido de ósmio em tampão cacodilato de sódio, lavadas com maleato e marcadas com 0,5% de acetato de uranil em tampão maleato. Depois de lavagens adicionais, as células foram desidratadas em concentrações ascendentes de etanol e inseridas em resina epon para microtomia.

Todas as nanopartículas encontradas no interior das células foram contadas, sendo que 15 células por condição experimental foram avaliadas. Os dados foram analisados pelo teste não paramétrico Wilcoxon considerando valores de $p < 0,05$ como diferenças significativas.

2.1.5 Avaliação das Vias de Internalização através de Citometria de Fluxo

Assim como a quantificação por TEM, os experimentos utilizando citometria de fluxo também foram feitos em pequena escala a fim de avaliar se

era possível quantificar as nanopartículas internalizadas com a sensibilidade necessária. Diferentemente dos experimentos em TEM, a quantificação por citometria de fluxo foi feita apenas com os AuNRs funcionalizados com a proteína DENV3E uma vez que esta era o alvo dos anticorpos de marcação. Os AuNRs não funcionalizados foram utilizados apenas para avaliar se havia alguma influência da própria nanopartícula sobre o sinal de fluorescência. Como se tratou de um experimento piloto, as células utilizadas aqui foram de uma linhagem fagocítica murina imortalizada, a RAW 264.7. O meio de cultura usado foi o DMEM suplementado com 10% de SFB, não variando assim a presença ou ausência de proteínas séricas. Como inibidor de fagocitose foi utilizada a *cytochalasin D* na concentração de 1 μ M.

Antes da preparação das amostras para a citometria de fluxo, foi realizada uma marcação das células com as nanopartículas internalizadas, observadas em microscópio de fluorescência, para verificar se a proteína DENV3E estava realmente marcada e se não havia ligações inespecíficas dos anticorpos. Para isso, as células RAW 264.7 foram plaqueadas na densidade de 1×10^6 células por poço em placas de 6 poços contendo uma lamínula estéril em cada poço e em seguida foram incubadas *overnight* a 37°C sob 5% de CO₂ para aderência celular. Após esse período, o meio foi removido, as células foram lavadas com PBS 1X e incubadas por 4 h nas seguintes condições: apenas DMEM (10%); 0,7 μ g de proteína DENV3E diluída em DMEM (10%); 30 μ L de AuNR puro diluído em DMEM (10%); e 30 μ L de AuNR funcionalizado diluído em DMEM (10%).

Terminada a incubação, o meio foi removido, as células foram lavadas com PBS 1X e então marcadas com anticorpo primário anti-Dengue vírus 1+2+3+4 [D1-11(3)] (Abcam) *overnight* a 4°C. Em seguida, as células foram lavadas e marcadas com anticorpo secundário anti-*mouse* IgG conjugado ao TRITC (Sigma) por 4 h a 4°C. Ao final, as células foram lavadas, as lamínulas foram fixadas nas lâminas utilizando o *Prolong Diamond Antifade Mountant* (Thermo Fisher Scientific), curadas *overnight* em temperatura ambiente e observadas ao microscópio EVOS™ FL (Thermo Fisher Scientific).

Para a citometria de fluxo, a etapa de incubação das células com as nanopartículas foi feita de forma semelhante àquela realizada para a microscopia de fluorescência. Entretanto, neste experimento avaliou-se

também a participação da via de fagocitose na internalização das nanopartículas. Por isso, os grupos em que se pretendeu inibir essa via foram primeiramente incubados com *cytochalasin D* (1 μ M) diluída em DMEM não suplementado, e os grupos não inibidos foram incubados apenas com DMEM por 1 h. Na sequência o meio foi removido, as células foram lavadas com PBS 1X e incubadas por 4 h nas mesmas condições do experimento anterior. Porém, nos grupos testados para a inibição de fagocitose adicionou-se *cytochalasin D* (1 μ M) ao meio.

Após o término da incubação, o meio foi removido, as células foram lavadas com PBS 1X, fixadas com paraformaldeído (2%), desalojadas da placa e transferidas para tubos de polipropileno. Então, fez-se a marcação das células *overnight* a 4°C com o anticorpo primário anti-Dengue vírus diluído em saponina (0,25%). Posteriormente, as células foram centrifugadas, o sobrenadante foi removido e foi feita a marcação com o anticorpo secundário anti-*mouse* IgG conjugado ao TRITC por 4 h a 4°C também diluído em saponina (0,25%). O controle celular, incubado apenas com meio, foi feito em duplicata, sendo uma delas tratada com os anticorpos para a avaliação de ligações inespecíficas. Por fim, as células foram centrifugadas, suspensas em PBS 1X e lidos no mínimo 20.000 eventos no citômetro FACSCanto™ II (BD Biosciences). Os resultados foram expressos em intensidade média de fluorescência.

2.1.6 Avaliação das Vias de Internalização através de Densidade Óptica (O.D.)

A densidade óptica das AuNPs está diretamente relacionada à concentração dessas nanopartículas em solução, ou seja, quanto maior a concentração, maior será sua densidade óptica. Para avaliar a aplicabilidade dessa técnica na quantificação de AuNPs, primeiramente foram feitas diluições de diferentes volumes de nanopartículas não funcionalizadas (1 a 200 μ L para um volume total de 1000 μ L) em DMEM (10%) a fim de se verificar a correspondência entre as diluições e as respectivas densidades ópticas. Essas diluições foram lidas no espectrofotômetro Shimadzu UV160U UV/Vis em

comprimento de onda de 780 nm, no qual a densidade óptica dessas AuNPs é máxima (Anexo I). Os valores das leituras foram plotados em um gráfico onde foi feita a regressão linear e calculado o coeficiente de determinação entre as variáveis.

Para a quantificação dos AuNRs internalizados, 1×10^6 células (RAW 264.7) foram plaqueadas por poço em placas de 6 poços e incubadas *overnight* a 37°C sob 5% de CO₂ para aderência celular. Após essa incubação, o meio foi removido, as células foram lavadas com PBS 1X e incubadas por 1 h apenas com DMEM sem SFB nos grupos controle ou com os inibidores diluídos em meio nas seguintes concentrações: 1 µM para *cytochalasin D* (inibidor de fagocitose); 80 µM para *dynasore* (inibidor de endocitose mediada por clatrina); 10 µM para *5-(N,N-dimethyl) amiloride hydrochloride* (inibidor de macropinocitose); e 1 µg/mL para *filipin III* (inibidor de endocitose mediada por caveolina). Esse pré-tratamento foi seguido da remoção do meio e de lavagem com PBS 1X. Então, as células foram incubadas por mais 4 h com 30 µL dos AuNRs diluídos em DMEM (10%) juntamente com os respectivos inibidores. Além dos grupos tratados com os inibidores, outros dois grupos foram avaliados: o controle de célula que foi incubado apenas com meio e o controle de endocitose no qual as células foram incubadas com as AuNPs sem qualquer um dos inibidores. Cada grupo foi testado em triplicata.

Terminada a incubação, o sobrenadante foi coletado para leitura da densidade óptica, representando os AuNRs não internalizados. As células foram lavadas com PBS 1X, desalojadas em meio DMEM e transferidas para tubos de polipropileno. Após essa etapa, as células foram submetidas a três ciclos de congelamento e descongelamento para lise celular seguida de centrifugação. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi suspenso em água bidestilada para posterior leitura no espectrofotômetro.

2.1.7 Avaliação das Vias de Internalização através de Microscopia de Fluorescência

As amostras para a microscopia de fluorescência foram preparadas em placas de 6 poços contendo uma lamínula estéril em cada poço. Os

macrófagos (BMDM) foram plaqueados na densidade de 5×10^5 células por poço em meio RPMI 05/10 e incubados *overnight* a 37°C sob 5% de CO₂ para aderência celular. Foram feitas simplicatas de 4 grupos: controle de célula, o qual foi utilizado para avaliar a autofluorescência; o controle de especificidade de anticorpo que foi feito para verificar se houve ligação inespecífica por parte do anticorpo secundário; as células incubadas com os AuNRs funcionalizados com a proteína DENV3E mas não permeabilizadas para se diferenciar o conteúdo endocitado daquele apenas aderido à membrana citoplasmática; e as células permeabilizadas e incubadas com as AuNPs funcionalizadas para avaliar o conteúdo internalizado.

Após a incubação, o meio foi removido, as células foram lavadas uma vez com PBS 1X e incubadas nas seguintes condições: o controle de células e de especificidade de anticorpo foram incubados com 1 mL de RPMI 05/10. As células a serem permeabilizadas ou não foram incubadas com 100 µL das nanopartículas funcionalizadas diluídas em 900 µL de RPMI 05/10. O tempo de incubação foi de 4 h.

Antecedendo o processo de marcação, as células foram lavadas duas vezes com PBS 1X. Na sequência, elas foram fixadas com 1 mL de paraformaldeído (4%) por 10 min e lavadas 3 vezes com PBS 1X. Então, as células foram permeabilizadas com 1 mL de Triton X-100/PBS (0,1%) por 20 min, exceto as células não permeabilizadas que foram incubadas apenas com 1 mL de PBS 1X. As células foram novamente lavadas 3 vezes com PBS 1 X e o bloqueio feito com 1 mL de BSA/PBS (1%) por 45 min. Em seguida, as células foram incubadas *overnight* a 4°C com o anticorpo primário anti-Dengue vírus diluído em solução de bloqueio, lavadas 4 vezes com PBS 1X e incubadas por mais 4 h a 4°C com o anticorpo secundário anti-*mouse* IgG conjugado ao TRITC, também diluído em solução de bloqueio. Por fim, as células foram lavadas 4 vezes com PBS 1X e em água bidestilada para a remoção de sais residuais do PBS. As lamínulas foram fixadas nas lâminas utilizando o *Prolong Diamond Antifade Mountant*, curadas *overnight* em temperatura ambiente e observadas ao microscópio confocal LSM 510 (Zeiss).

V – Resultados

1. Funcionalização dos AuNRs

Para a funcionalização dos AuNRs, diferentes quantidades da proteína DENV3E (0,7 a 14,0 μg) foram utilizadas para verificar o ponto de saturação de ligação da proteína às nanopartículas. Primeiramente, os AuNRs foram funcionalizados com o ácido lipóico (TA). O sucesso dessa ligação pôde ser confirmado pelo *red-shift* da curva (deslocamento para a direita) de 780 nm para 803 nm (Fig. 14). Quando funcionalizado com a proteína na quantidade de 0,7 μg , a curva sofreu um *blue-shift* (deslocamento para a esquerda) para 799 nm, também indicando a eficiência da funcionalização. Não foram apresentadas no gráfico as alterações da curva em resposta à adição de EDAC/NHS.

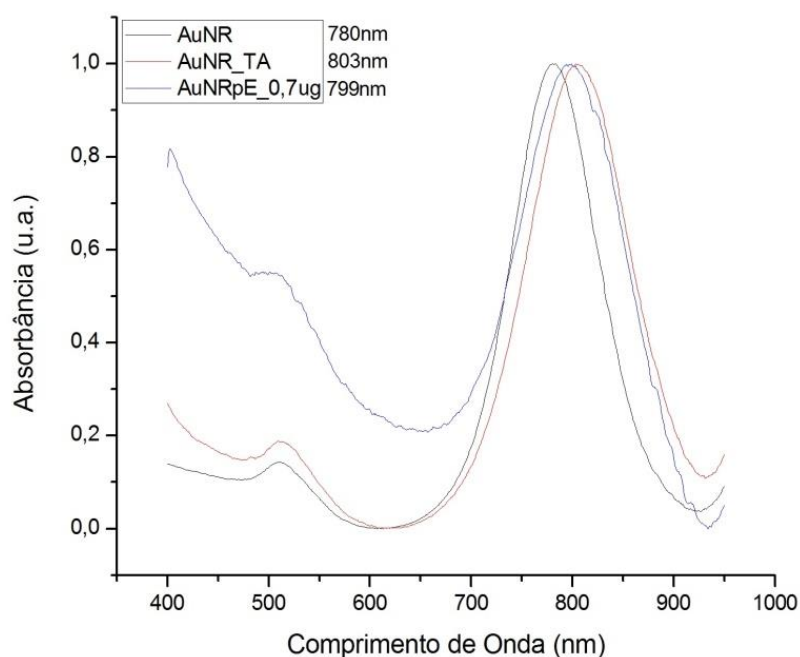


Figura 14. Funcionalização dos AuNRs. As nanopartículas foram funcionalizadas o ácido lipóico (TA), causando um *red-shift* da curva, e logo após com a proteína DENV3E, sendo observado um *blue-shift*. AuNR: nanopartículas puras; AuNR_TA: nanopartículas funcionalizadas com TA; AuNRpE: nanopartículas funcionalizadas com a proteína DENV3E.

Na funcionalização dos AuNRs com quantidades de proteína maiores que 0,7 μg , foi observado o fenômeno de *red-shift*, correspondendo este à saturação de funcionalização das AuNPs (Fig. 15).

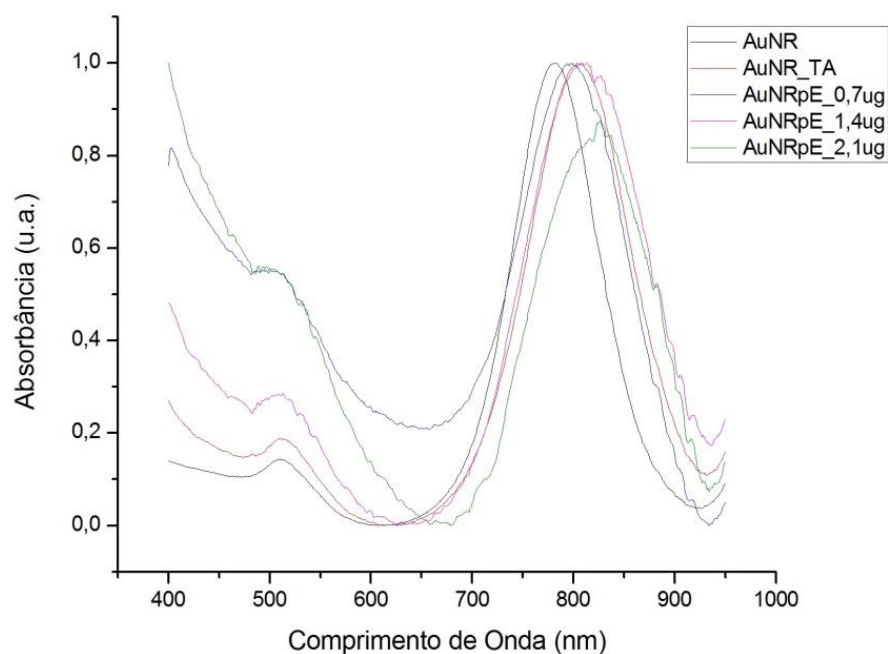


Figura 15. Saturação da funcionalização dos AuNRs. Após a funcionalização das nanopartículas com o ácido lipóico (TA), elas foram funcionalizadas com quantidades crescentes da proteína DENV3E, sendo que a partir da quantidade de 1,7 μg nota-se um *red-shift* resultante da saturação de ligação da proteína às AuNPs. As quantidades de proteínas superiores a 2,1 μg não tiveram suas curvas plotadas no gráfico a fim de facilitar a visualização dos dados. AuNR: nanopartículas puras; AuNR_TA: nanopartículas funcionalizadas com TA; AuNRpE: nanopartículas funcionalizadas com a proteína DENV3E.

2. Viabilidade Celular

2.1 Densidade Celular

As células obtidas da medula óssea de camundongos foram diferenciadas em macrófagos primários. A fim de se avaliar a confluência ideal desses macrófagos e a viabilidade celular em meio de cultura não suplementado com SFB, foram feitas observações ao microscópio de diferentes concentrações celulares juntamente com os testes de MTT. Além da densidade celular e a ausência ou presença de proteínas séricas, também foi variado o tempo de incubação. Os resultados de MTT são apresentados na figura 16.

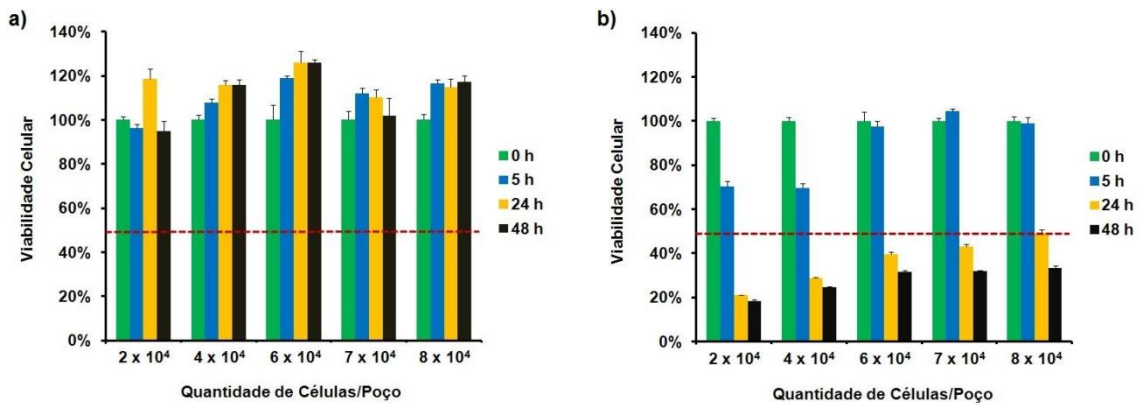


Figura 16. Viabilidade celular quanto à densidade celular. a) Células cultivadas em meio RPMI 05/10 (contendo proteínas séricas). b) Células cultivadas em meio RPMI 0 (sem proteínas séricas). A linha vermelha tracejada representa a viabilidade de 50%. A viabilidade no tempo de 0 h é considerada como 100% em todas as diluições celulares. A viabilidade nos demais tempos foi calculada em relação à viabilidade de 100% (tempo de 0 h).

As células cultivadas em meio RPMI 05/10 (suplementado com SFB e sobrenadante de células L929) não apresentaram reduções na viabilidade em nenhum dos tempos e em nenhuma das concentrações testadas (Fig. 16a). Por outro lado, as células mantidas em RPMI 0 (desprovido de SFB e sobrenadante de células L929) sofreram alterações na viabilidade. Para os tempos de 24 e 48 h, todas as concentrações apresentaram viabilidade inferior a 50% (Fig. 16b). Para o tempo de 5 h, a viabilidade se mantém próxima aos 100% a partir da concentração de 6×10^4 células/poço (placa de 96 poços). Portanto, esses dados juntamente com a observação da confluência celular ao microscópio levaram à escolha da concentração de 6×10^4 células/poço como a ideal para o restante dos experimentos, tendo 5 h (1 h de pré-tratamento com os inibidores mais 4 h de tratamento com os AuNRs) como o tempo máximo de incubação.

2.2 Diluente dos Inibidores de Endocitose

Os inibidores de endocitose foram diluídos em DMSO. Como esse diluente é tóxico para as células em determinadas concentrações, a viabilidade celular foi avaliada para diluições entre 0,1 e 3% de DMSO em relação ao volume total de meio em contato com as células. O tempo total de incubação foi de 5 h, mimetizando o tempo máximo que os experimentos de inibição propriamente ditos foram feitos. Também foi avaliada a citotoxicidade sob a

presença ou ausência de proteínas séricas (SFB). A figura 17 representa os resultados do teste de MTT.

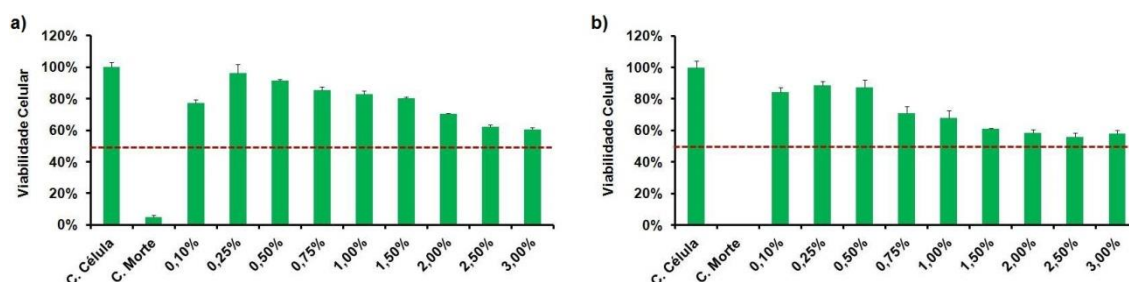


Figura 17. Viabilidade celular quanto à concentração de DMSO - diluente dos inibidores de endocitose. a) Células cultivadas em meio RPMI 05/10 (contendo proteínas séricas). b) Células cultivadas em meio RPMI 0 (sem proteínas séricas). A linha vermelha tracejada representa a viabilidade de 50%. A viabilidade do controle de células (C. Célula) é considerada como 100%, sendo as demais viabilidades calculadas em relação a ela. O controle de morte (C. Morte) corresponde às células tratadas com Triton X-100 (2,5%).

De forma geral, a viabilidade celular diminuiu conforme o aumento na concentração de DMSO no meio, independentemente de haver ou não proteínas séricas no meio de cultura. Entretanto, enquanto as células incubadas em meio RPMI 05/10 apresentaram redução da viabilidade inferior a 80% a partir da diluição de 2% de DMSO (Fig. 17a), as células incubadas em meio RPMI 0 tiveram esse decréscimo a partir da diluição de 0,75% (Fig. 17b). Contudo, na diluição de 1%, a viabilidade celular ainda se manteve ao redor de 70%. Como a diluição de 1% não compromete mais que 50% das células em ambos os casos, e essa mesma diluição é adequada de forma que o volume a ser usado dos inibidores não seja inferior a 1 μ L, essa foi a diluição escolhida de DMSO.

2.3 Inibidores de Endocitose

Os inibidores de endocitose, assim como o DMSO, podem ser tóxicos para as células a ponto de inviabilizar o estudo das vias em condições fisiologicamente passíveis de avaliação. Por isso, a viabilidade celular foi avaliada frente às diferentes concentrações dos inibidores. As concentrações máximas e mínimas dos 4 inibidores foram estabelecidas com base nas concentrações de uso encontradas na literatura (FRANÇA *et al.*, 2011; BARTNECK *et al.*, 2010; HUSSAIN *et al.*, 2011; NAGASAWA *et al.*, 2014). O

tempo total de incubação foi de 5 h, porém, quando a menor concentração de determinado inibidor ainda se mostrou tóxica, o tempo de incubação foi reduzido para 2 h (1 h de pré-tratamento mais 1 h de tratamento). Esses experimentos foram conduzidos em meio contendo ou não proteínas séricas e a viabilidade foi avaliada pelo teste de MTT.

Para as células tratadas com *cytochalasin D* (inibidor de fagocitose) em meio RPMI 05/10, a viabilidade superior a 50% foi observada até a concentração de 4 μM (Fig. 18a). No entanto, em RPMI 0 a viabilidade celular se mostrou inferior a 50% até na menor concentração desse inibidor, 1 μM , embora isso não tenha ocorrido para a concentração de 15 μM (Fig. 18b). Devido a esse fato, o mesmo experimento (em RPMI 0) foi repetido para o tempo total de 2 h. Nessa condição, todas as concentrações avaliadas mantiveram a viabilidade celular acima de 50%, e para algumas concentrações, os valores de viabilidade superaram até mesmo o controle (Fig. 18c). Esses dados juntamente com os da literatura levaram à escolha da concentração de 1 μM para os testes de inibição, sendo que para as células incubadas em RPMI 0, o tempo máximo para incubação com esse inibidor foi de 2 h.

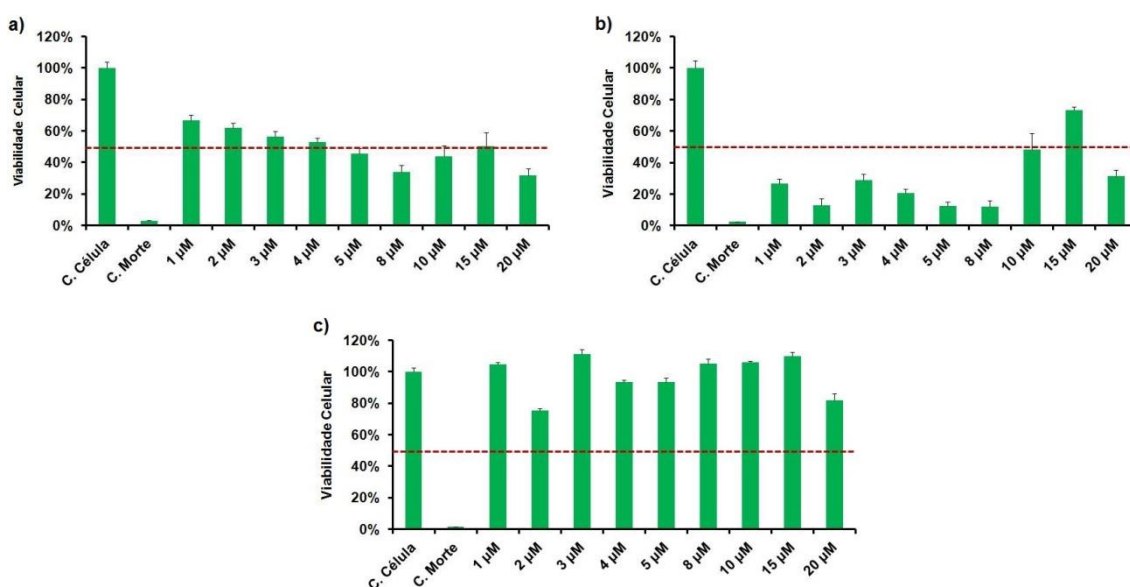


Figura 18. Viabilidade celular quanto à concentração de *cytochalasin D* - inibidor de fagocitose. a) Células cultivadas em meio RPMI 05/10 no tempo total de 5 h. b) Células cultivadas em meio RPMI 0 no tempo total de 5 h. c) Células cultivadas em meio RPMI 0 no tempo total de 2 h. A linha vermelha tracejada representa a viabilidade de 50%. A viabilidade do controle de célula (C. Célula) é considerada como 100%, sendo as demais viabilidades calculadas em relação a ela. O controle de morte (C. Morte) corresponde às células tratadas com Triton X-100 (2,5%).

A droga *dynasore* (inibidor de endocitose mediada por clatrina) não afetou negativamente a viabilidade celular em nenhuma das concentrações testadas no tempo de 5 h. Isso foi observado tanto na presença (Fig. 19a) quanto na ausência de proteínas séricas no meio (Fig. 19b). Para a maioria das concentrações, a viabilidade celular atingiu valores maiores que o do controle. Baseado nesses resultados e na literatura, a concentração de 80 μM foi a escolhida para os testes inibitórios.

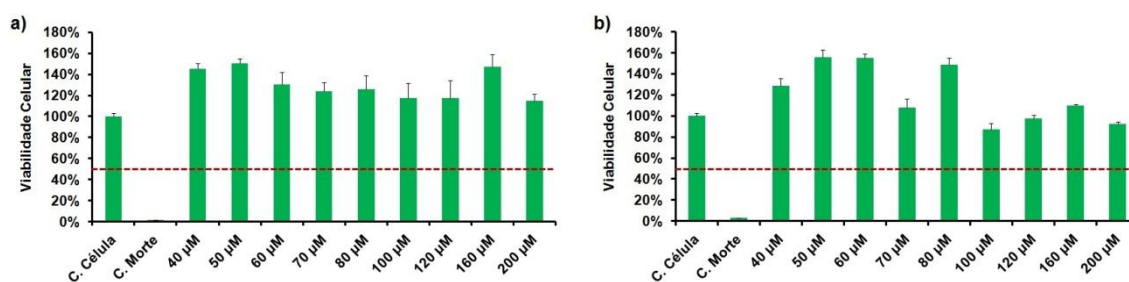


Figura 19. Viabilidade celular quanto à concentração de *dynasore* - inibidor de endocitose mediada por clatrina. a) Células cultivadas em meio RPMI 05/10 no tempo total de 5 h. b) Células cultivadas em meio RPMI 0 no tempo total de 5 h. A linha vermelha tracejada representa a viabilidade de 50%. A viabilidade do controle de célula (C. Célula) é considerada como 100%, sendo as demais viabilidades calculadas em relação a ela. O controle de morte (C. Morte) corresponde às células tratadas com Triton X-100 (2,5%).

O tratamento com a 5-(*N,N*-dimethyl) *amiloride hydrochloride* (inibidor de macropinocitose) também não reduziu a viabilidade celular abaixo dos 50% em nenhuma das concentrações no tempo de 5 h. A concentração de 10 μM , escolhida como a ideal para os experimentos de inibição, manteve a viabilidade celular acima dos 80% tanto no meio contendo proteínas séricas (Fig. 20a) quanto no meio não suplementado com essas proteínas (Fig. 20b).

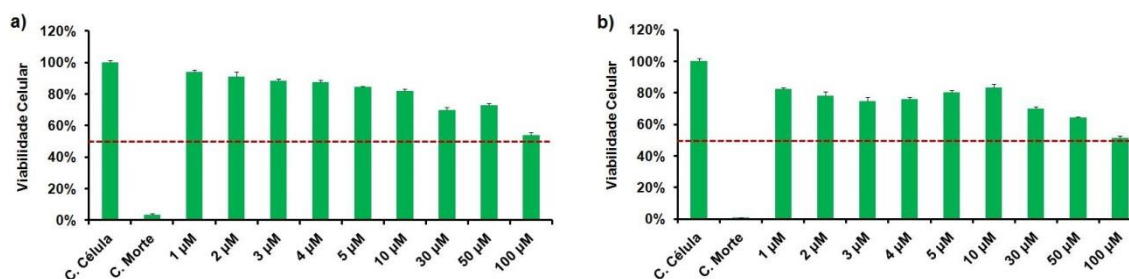


Figura 20. Viabilidade celular quanto à concentração de 5-(*N,N*-dimethyl) *amiloride hydrochloride* - inibidor de macropinocitose. a) Células cultivadas em meio RPMI 05/10 no tempo total de 5 h. b) Células cultivadas em meio RPMI 0 no tempo total de 5 h. A linha vermelha tracejada representa a viabilidade de 50%. A viabilidade do controle de célula (C. Célula) é considerada como 100%, sendo as demais viabilidades calculadas em relação a ela. O controle de morte (C. Morte) corresponde às células tratadas com Triton X-100 (2,5%).

A *filipin III* (inibidor de endocitose mediada por caveolina) não diminuiu drasticamente (< 50%) a viabilidade celular em nenhuma das concentrações a que as células foram submetidas durante o período de 5 h. Em ambas as condições, RPMI 05/10 (Fig. 21a) e RPMI 0 (Fig. 21b), houve algumas concentrações do inibidor em que a viabilidade celular foi maior que a viabilidade do controle de células. A concentração de 1 µg/mL, que manteve a viabilidade celular próxima aos 100%, foi escolhida para os experimentos de inibição com base nesses resultados e na literatura.

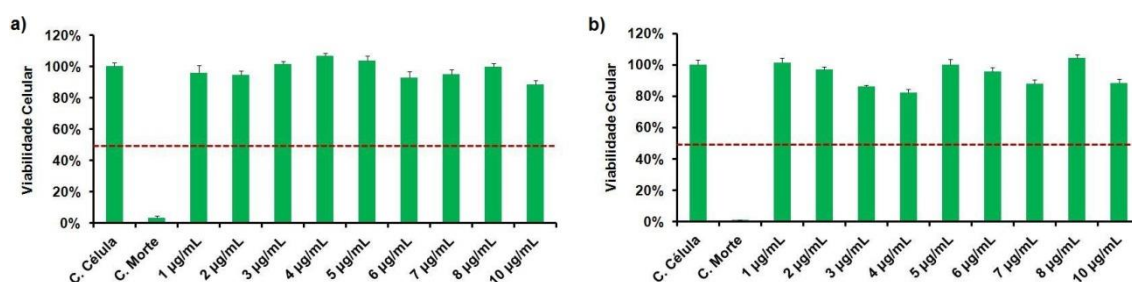


Figura 21. Viabilidade celular quanto à concentração de *filipin III* - inibidor de endocitose mediada por caveolina. a) Células cultivadas em meio RPMI 05/10 no tempo total de 5 h. b) Células cultivadas em meio RPMI 0 no tempo total de 5 h. A linha vermelha tracejada representa a viabilidade de 50%. A viabilidade do controle de célula (C. Célula) é considerada como 100%, sendo as demais viabilidades calculadas em relação a ela. O controle de morte (C. Morte) corresponde às células tratadas com Triton X-100 (2,5%).

2.4 Nanobastões de Ouro e CTAB

Para avaliar a citotoxicidade dos AuNRs puros e funcionalizados com a proteína E, foram feitas diluições seriadas de $1/10^0$ a $1/10^6$ e incubadas com os macrófagos pelo tempo de 5 h. A viabilidade celular foi avaliada pelo teste de MTT nas condições de ausência e presença de proteínas séricas.

A diluição ideal dos AuNRs puros foi a de $1/10^2$ pois ela não comprometeu a viabilidade celular tanto em RPMI 05/10 (presença de proteínas séricas) quanto em RPMI 0 (ausência de proteínas séricas) (Fig. 22). Na diluição de $1/10^1$, apesar de as células apresentarem viabilidade maior que 50% em RPMI 05/10, o mesmo não aconteceu em RPMI 0. Considerando que a diluição de $1/10^0$ (diluição 1:2 entre meio de cultura e AuNRs) foi seguida de 2 diluições 1:10 até a diluição de $1/10^2$, e que foram colocados 200 µl dessa diluição por poço (6×10^4 células/poço em placas de 96 poços), a quantidade de nanopartículas adicionadas por célula foi de $1,23 \times 10^4$ ($7,4 \times 10^{11}$

nanopartículas/mL – concentração inicial informada pelo fabricante – Anexo I). Esses valores foram utilizados como base para alterar a escala, quando necessário, dos outros experimentos.

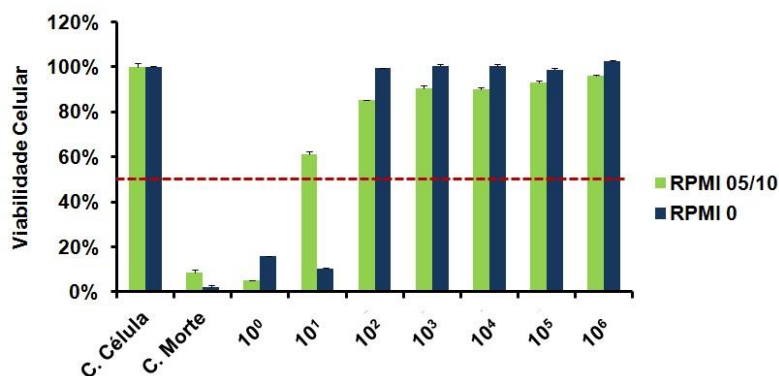


Figura 22. Viabilidade celular quanto à concentração de AuNRs não funcionalizados. As diferentes concentrações dos nanobastões de ouro foram avaliadas em meio RPMI 05/10 e 0 no tempo total de 5 h. A linha vermelha tracejada representa a viabilidade de 50%. A viabilidade do controle de célula (C. Célula) é considerada como 100%, sendo as demais viabilidades calculadas em relação a ela. O controle de morte (C. Morte) corresponde às células tratadas com Triton X-100 (2,5%).

Os AuNRs funcionalizados com a proteína E mantiveram a viabilidade celular acima de 50% a partir da diluição 1/10¹ (Fig. 23), o que mostra uma redução da citotoxicidade em relação aos AuNRs não funcionalizados. No entanto, para manter as células sob as mesmas concentrações de nanopartículas funcionalizadas ou não, a diluição de 1/10² foi a escolhida.

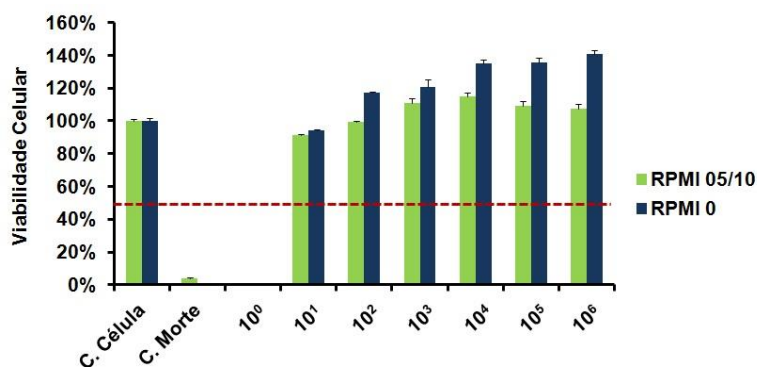


Figura 23. Viabilidade celular quanto à concentração de AuNRs funcionalizados com a proteína E. As diferentes concentrações dos nanobastões de ouro foram avaliadas em meio RPMI 05/10 e 0 no tempo total de 5 h. A linha vermelha tracejada representa a viabilidade de 50%. A viabilidade do controle de célula (C. Célula) é considerada como 100%, sendo as demais viabilidades calculadas em relação a ela. O controle de morte (C. Morte) corresponde às células tratadas com Triton X-100 (2,5%).

As diluições do CTAB foram correspondentes às diluições dos AuNRs, sendo que a concentração de CTAB presente na diluição 1/10⁰, 3 mM, é a

mesma encontrada nessa diluição para as AuNPs puras (Anexo I). Semelhante a estas, a diluição $1/10^2$ do CTAB foi a que possibilitou uma viabilidade celular maior que 50% tanto em RPMI 05/10 como em RPMI 0 (Fig. 24). É interessante notar que o perfil de citotoxicidade das diluições menores, $1/10^0$ e $1/10^1$, é muito parecido àquele visto para os AuNRs puros (Fig. 22).

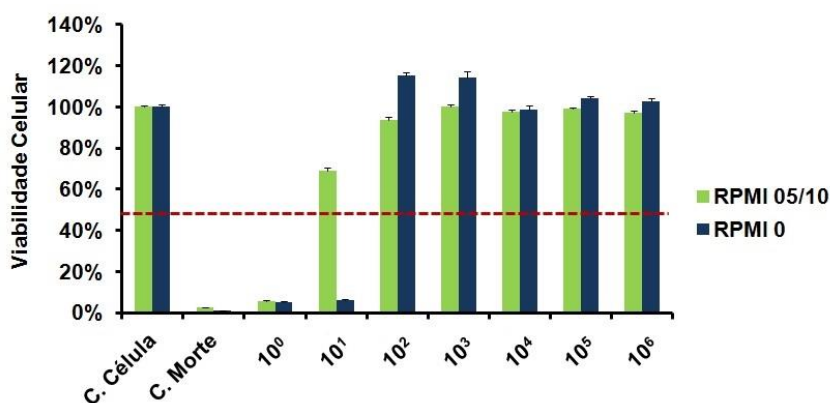


Figura 24. Viabilidade celular quanto à concentração de CTAB. A diluição de 10^0 representa a concentração de 3 mM de CTAB, equivalente à encontrada na diluição de 10^0 dos AuNRs puros. As diferentes concentrações foram avaliadas em meio RPMI 05/10 e 0 no tempo total de 5 h. A linha vermelha tracejada representa a viabilidade de 50%. A viabilidade do controle de célula (C. Célula) é considerada como 100%, sendo as demais viabilidades calculadas em relação a ela. O controle de morte (C. Morte) corresponde às células tratadas com Triton X-100 (2,5%).

3. Vias de Endocitose de AuNPs

3.1 Quantificação por Microscopia Eletrônica

Os AuNRs endocitados pelos macrófagos foram contados em um total de 15 seções, cada uma representando uma célula. Dessa forma, foram avaliadas 15 células no grupo controle, não tratado com o inibidor de fagocitose, e 15 células no grupo sob efeito da droga. Na maioria dos casos, as nanopartículas foram encontradas no interior de vesículas e em baixas quantidades, independente do tratamento de inibição. Quando houve mais de um AuNR no interior da vesícula, eles geralmente estavam aglomerados. A figuras 25 ilustra os AuNRs internalizados pelos macrófagos.

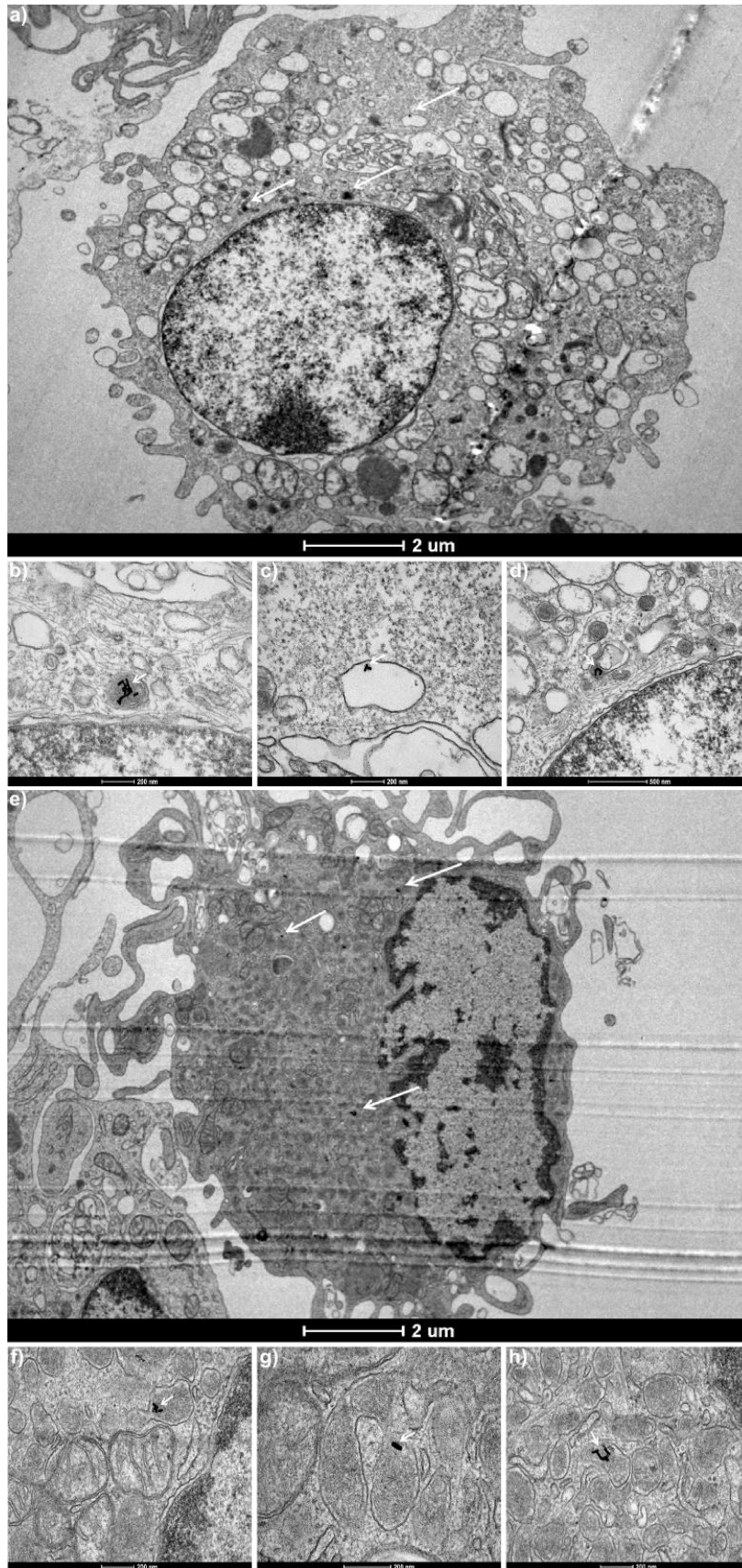


Figura 25. Micrografias de macrófagos murino contendo AuNRs no interior de vesículas. a), b), c), d) célula com a via de fagocitose não inibida; e), f), g), h) célula tratada com o inibidor. Imagens em menor aumento de toda a célula. Imagens em maior aumento das respectivas AuNPs endocitadas. As setas brancas indicam os AuNRs.

Como os dados de quantificação das AuNPs não seguiram uma distribuição normal, foi utilizado o teste não paramétrico Wilcoxon que mostrou não existir diferença significativa ($p=0,469$) na quantidade de nanopartículas endocitadas entre os grupos tratado e não tratado com o inibidor de fagocitose (Fig. 26). Embora tenha havido um grande desvio-padrão, a média da quantidade de AuNPs no grupo tratado ($1,4 \pm 2,68$ partículas) foi 48% menor que a média encontrada no controle ($2,67 \pm 5,25$ partículas).

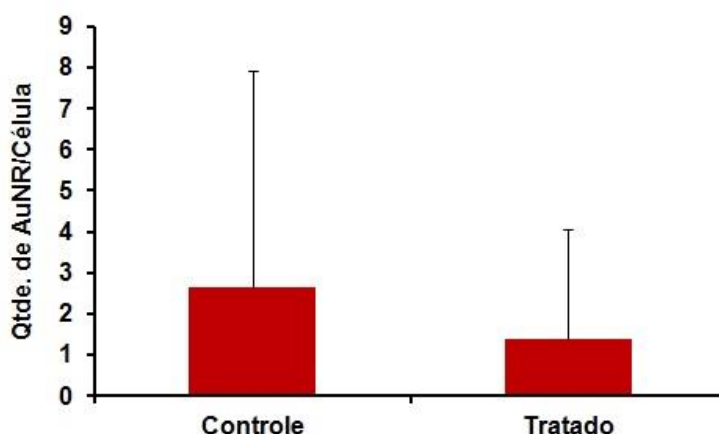


Figura 26. Quantificação de AuNRs endocitados por macrófagos. Foram contadas todas as nanopartículas encontradas no interior de 15 células tanto para o grupo controle (não tratado com o inibidor de fagocitose) quanto para o grupo tratado. Não houve diferença estatística entre os grupos ($p=0,469$).

3.2 Quantificação por Citometria de Fluxo

Primeiramente, antes que os experimentos de quantificação por citometria de fluxo fossem conduzidos, foi necessário saber se a marcação com anticorpos contra a proteína DENV3E estava ocorrendo de forma específica. Para isso, utilizou-se um grupo de células (RAW 264.7) controle, incubadas apenas com meio; um grupo em que as células foram incubadas com os AuNRs puros; um outro grupo em que as células foram incubadas apenas com a proteína; e um último grupo no qual a incubação foi feita utilizando os AuNRs funcionalizados com a proteína DENV3E. Todos os grupos passaram pelos processos de marcação com os anticorpos primários e secundários.

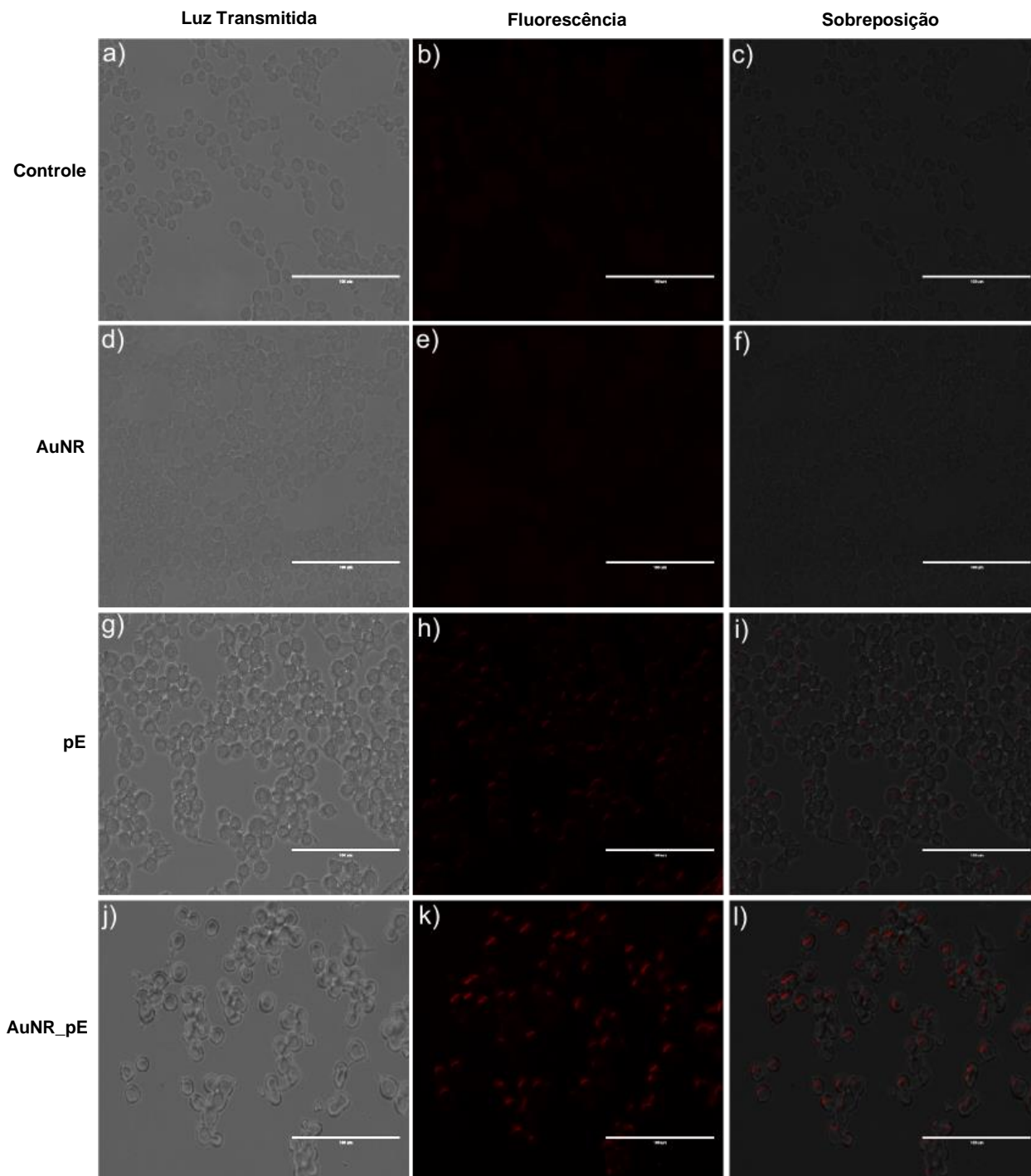


Figura 27. Marcação fluorescente de células RAW 264.7 dos grupos controle (a,b,c), incubado com os AuNRs não funcionalizados (d, e, f), incubados com a proteína DENV3E (g, h, i) e com os AuNRs funcionalizados com esta proteína (j, k, l). AuNR: nanobastões de ouro; pE: proteína DENV3E; AuNR_pE: nanobastões de ouro funcionalizados com a proteína DENV3E.

Os grupos controle (Fig. 27a, b, c) e tratado com os AuNRs puros (Fig. 27d, e, f) não apresentaram uma intensidade de fluorescência considerável, apenas uma fraca sombra provavelmente derivada da autofluorescência celular.

Por outro lado, os grupos que foram incubados apenas com a proteína DENV3E (Fig. 27g, h, i) ou com os AuNRs funcionalizados com esta proteína (Fig. 27j, k, l) exibiram certa intensidade de fluorescência. Aparentemente, a fluorescência observada no grupo tratado com as nanopartículas funcionalizadas foi maior que aquela vista no grupo incubado apenas com a proteína. Esses resultados permitiram que os experimentos de quantificação através da citometria prosseguissem.

A citometria de fluxo foi realizada para os mesmos grupos testados na microscopia de fluorescência. No entanto, foi adicionado mais um grupo de controle de células que não passou pelas etapas de marcação com os anticorpos. E também houve a variação de tratamento ou não com o inibidor de fagocitose nesses grupos.

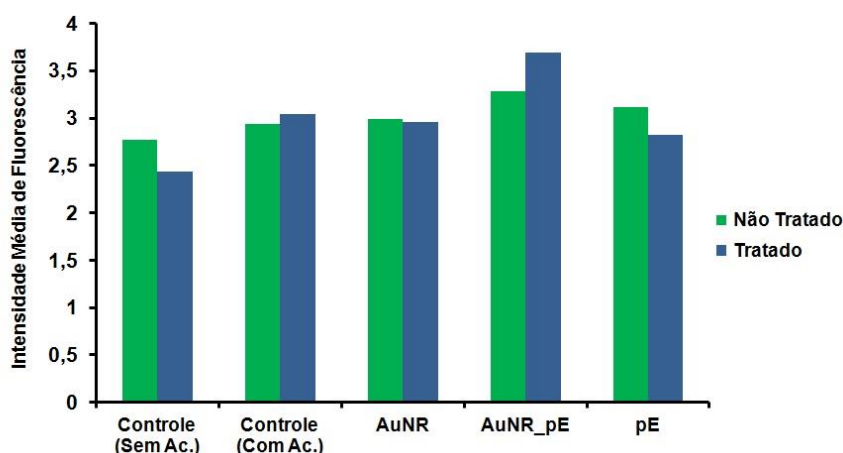


Figura 28. Quantificação da proteína DENV3E pura ou funcionalizada aos AuNRs em células RAW264.7. A proteína endocitada pelas células foi primeiramente marcada com um anticorpo anti-Dengue vírus e secundariamente com anticorpo anti-IgG *mouse* conjugado à TRITC. A quantificação foi feita com base na intensidade média do sinal de fluorescência. Não tratado: células que não foram tratadas com o inibidor de fagocitose; Tratado: células tratadas com o inibidor; Controle (Sem Ac.): células incubadas apenas com meio e que não foram marcadas com anticorpos; Controle (Com Ac.): células incubadas apenas com meio e marcadas com anticorpos; AuNR: células incubadas com os AuNRs puros; AuNR_pE: células incubadas com os AuNRs funcionalizados com a proteína DENV3E; pE: células incubadas com a proteína DENV3E.

A quantificação por citometria de fluxo resultou em dados um pouco divergentes dos achados na microscopia de fluorescência. Primeiramente houve um aumento da intensidade média de fluorescência no controle de células submetido às etapas de marcação com anticorpos [Controle (Com Ac.)] em relação ao controle não marcado [Controle (Sem Ac.)], independente do tratamento com o inibidor (Fig. 28). Esse aumento parece que se manteve no grupo incubado com os AuNRs puros (AuNR). No grupo incubado com a

nanopartícula funcionalizada com a proteína DENV3E (AuNR_pE) foi observado um aumento na intensidade média de fluorescência tanto nas células tratadas quanto nas não tratadas com o inibidor. Nesse mesmo grupo, o nível de fluorescência das células tratadas com o inibidor foi maior que nas células não tratadas. Já no grupo incubado apenas com a proteína (pE), houve aumento da intensidade de fluorescência em relação aos grupos Controle (Com Ac.), Controle (Sem Ac.) e AuNR para as células não tratadas com o inibidor, mas não para as células tratadas. Ainda nesse grupo (pE), a intensidade de fluorescência foi maior nas células não tratadas com o inibidor em comparação às células tratadas. Independentemente do tratamento com o inibidor, a fluorescência foi mais acentuada no grupo AuNR_pE em relação ao grupo pE.

3.3 Quantificação por Densidade Óptica

Os AuNRs utilizados neste estudo apresentaram um pico de absorção máxima da luz quando irradiados em um comprimento de onda de 780 nm (Anexo I). O valor da densidade óptica, por sua vez, é condizente com a concentração de nanopartículas em solução. Quanto maior a densidade óptica, maior é a concentração. Por esse motivo, essa técnica foi avaliada quanto a sua sensibilidade na quantificação de AuNPs endocitadas.

Primeiramente, foram feitas diluições decrescentes (0 a 200 μ l) dos AuNRs puros em meio DMEM (10%) que tiveram suas densidades ópticas aferidas. Esses dados mostraram que esta técnica poderia ser uma boa ferramenta de quantificação, visto que os valores obtidos nas leituras se adequaram perfeitamente ao modelo de regressão linear com valor de R^2 igual a 0,9962 (Fig. 29).

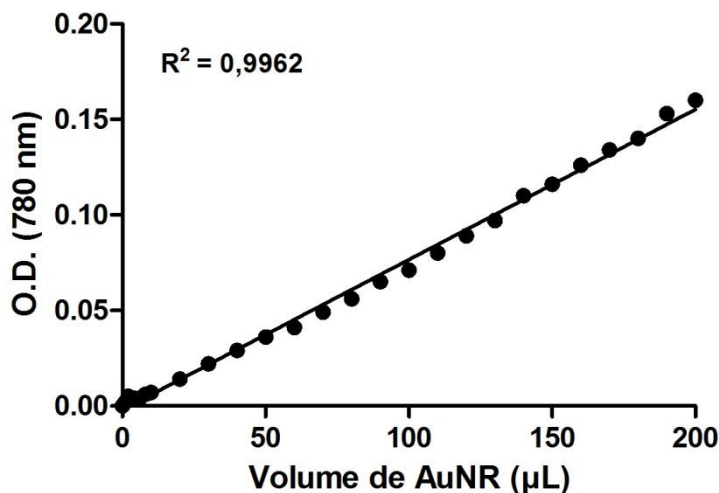


Figura 29. Representação das medidas de O.D. em 780 nm pelo volume de AuNRs. Os dados foram analisados segundo o modelo de regressão linear. O.D.: densidade óptica; R²: coeficiente de determinação.

Amparada nos resultados do experimento anterior, a quantificação das partículas internalizadas foi feita através da O.D. utilizando-se 4 inibidores de vias diferentes de endocitose. Além desses 4 grupos, também foi feito o controle de células (RAW 264.7) que não foi tratado com nenhum dos inibidores e nem foi incubado com os AuNRs. E o controle de endocitose em que as células foram incubadas com as AuNPs mas sem qualquer inibição das vias de internalização. As leituras de O.D. foram realizadas tanto para o conteúdo do lisado celular quanto para o sobrenadante, sendo cada condição experimental avaliada em triplicata.

Os valores provenientes da leitura dos lisados dos grupos Controle e AuNR (Fig. 30) deveriam nortear os valores dos grupos tratados com os inibidores. Como a densidade óptica do controle representa os *debris* oriundos da lise celular, e o grupo AuNR se refere aos *debris* somados às partículas internalizadas, esperava-se que nos casos de inibição da endocitose, os valores de O.D. permanecessem entre os dois extremos. Quando as vias de macropinocitose e endocitose por clatrina foram inibidas, a densidade óptica atingiu valores abaixo do controle, o que foi inesperado. Já quando a endocitose mediada por caveolina foi inibida, os valores de leitura ficaram 67% acima do grupo AuNR – considerado como a taxa de internalização máxima por não ter sido tratado com nenhum dos inibidores. Apenas a inibição da fagocitose/macropinocitose apresentou redução da internalização dentro do

intervalo esperado, correspondendo a uma diminuição aproximada de 67% em relação ao grupo AuNR. É válido ressaltar que os valores das replicatas intragrupo foram muito divergentes, refletidos no grande desvio padrão observado (Fig. 30).

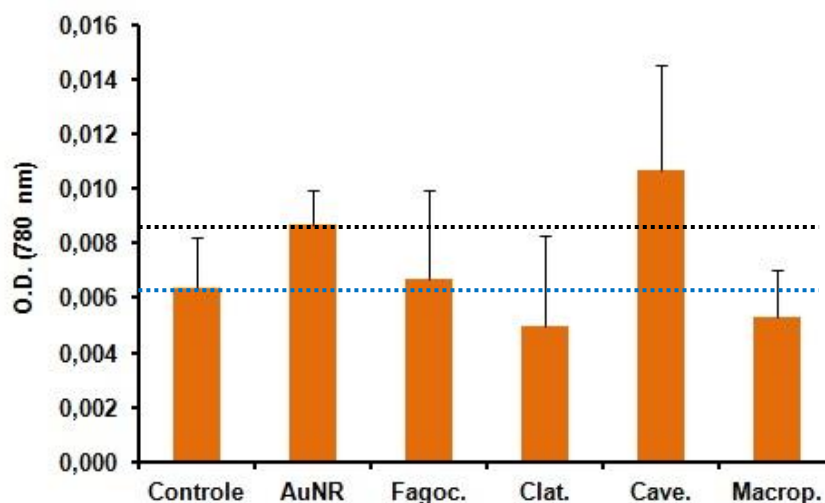


Figura 30. Quantificação de AuNRs internalizados através da densidade óptica em comprimento de onda de 780 nm. A linha azul tracejada representa o ponto em que não há internalização de nanopartículas (controle). A linha preta tracejada representa o ponto de quantidade máxima internalizada – células não tratadas com qualquer inibidor (AuNR). O.D.: densidade óptica; Controle: células incubadas apenas com meio; AuNR: células incubadas com as nanopartículas; Fagoc.: células incubadas com as nanopartículas e tratadas com inibidor de fagocitose/macropinocitose; Clat.: células incubadas com as nanopartículas e tratadas com inibidor de clatrina; Cave.: células incubadas com as nanopartículas e tratadas com inibidor de caveolina; Macrop.: células incubadas com as nanopartículas e tratadas com inibidor de macropinocitose.

Os valores das leituras dos sobrenadantes não destoaram muito entre os grupos, permanecendo no mesmo patamar (O.D. = 0,020) em todos os grupos que foram incubados com as nanopartículas (Fig. 31). Comparando, de forma genérica, os valores de O.D. dos sobrenadantes com os dos lisados, fica evidente que a maior parte dos AuNRs não foi endocitada.

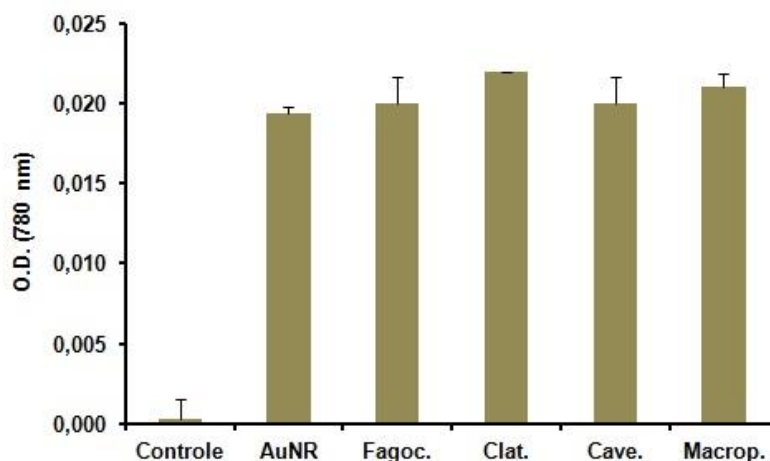


Figura 31. Quantificação de AuNRs no sobrenadante através da densidade óptica em comprimento de onda de 780 nm. O.D.: densidade óptica; Controle: células incubadas apenas com meio; AuNR: células incubadas com as nanopartículas; Fagoc.: células incubadas com as nanopartículas e tratadas com inibidor de fagocitose/macropinocitose; Clat.: células incubadas com as nanopartículas e tratadas com inibidor de clatrina; Cave.: células incubadas com as nanopartículas e tratadas com inibidor de caveolina; Macrop.: células incubadas com as nanopartículas e tratadas com inibidor de macropinocitose.

3.4 Análise dos AuNRs por Microscopia de Fluorescência

As análises por microscopia confocal foram feitas como um experimento piloto para verificar se era possível marcar e observar os AuNRs funcionalizados com a proteína DENV3E no interior dos macrófagos (BMDM). Como controle, foram feitas células sem qualquer marcação (Fig. 32a) e células incubadas com o anticorpo secundário (Fig. 32b) para o controle da especificidade de ligação deste. Em ambos os casos, nenhum sinal de fluorescência foi observado.

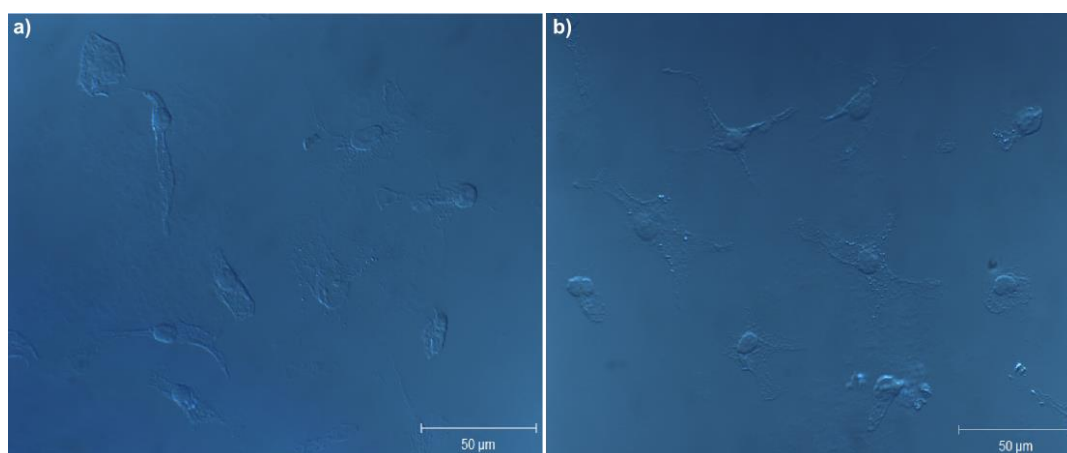


Figura 32. Imagens de DIC (do inglês, *Differential Interference Contrast*) do controle de células, sem qualquer tratamento (a), e das células incubadas apenas com o anticorpo secundário (b) para controle da especificidade de ligação. As imagens de fluorescência não são apresentadas por conterem apenas ruídos.

As células não permeabilizadas tratadas com as nanopartículas funcionalizadas apresentaram baixo grau de fluorescência, possível de ser vista apenas pela observação direta ao microscópio – os *lasers* não foram capazes de detectar a baixa intensidade do sinal. O único ponto de fluorescência detectável (Fig. 33b) pareceu ser um sinal correspondente a um artefato observado na imagem de DIC (Fig. 33a). As imagens não foram sobrepostas devido à configuração do microscópio confocal utilizado que não permite a sobreposição das imagens adquiridas pelo sistema de luz com aquelas obtidas pelo conjunto de *lasers*.

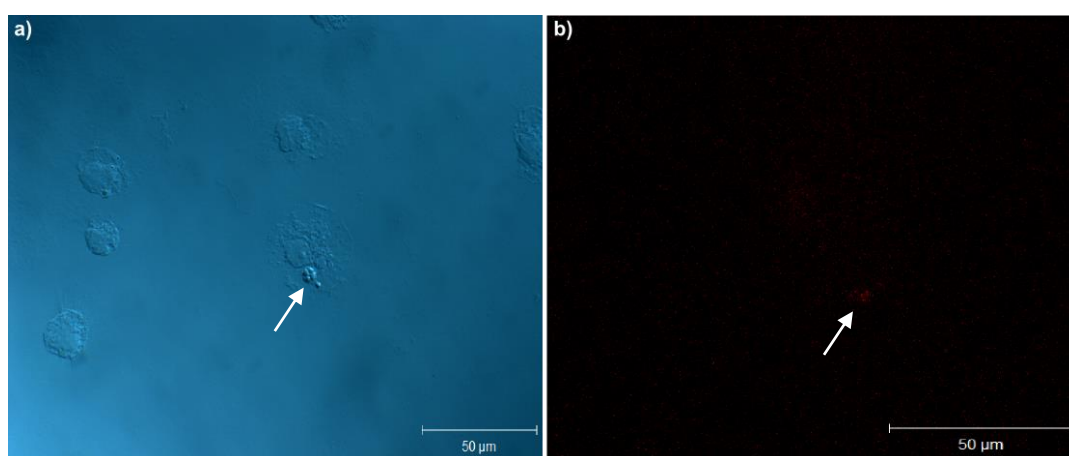


Figura 33. Imagens de DIC (a) e de fluorescência (b) das células não permeabilizadas e incubadas com os AuNRs funcionalizados com a proteína DENV3E. As setas indicam um provável artefato na imagem a) e sua fluorescência correspondente na imagem b).

Os macrófagos permeabilizados e incubados com as AuNPs funcionalizadas apresentaram altos sinais de fluorescência (Fig. 34b e d). Apesar de ter sido encontrada, a fluorescência não estava presente em todas as células. Além desse fato, e como observado nas células não permeabilizadas, houve sinais de fluorescência aparentemente derivados de artefatos (Fig. 34f).

A morfologia das células também foi alterada naquelas que ficaram em contato com as nanopartículas, passando de uma forma estrelada (Fig. 32a e b), com as projeções da membrana citoplasmática bem evidentes, para um formato globular (Fig. 33a, 34a, c, e).

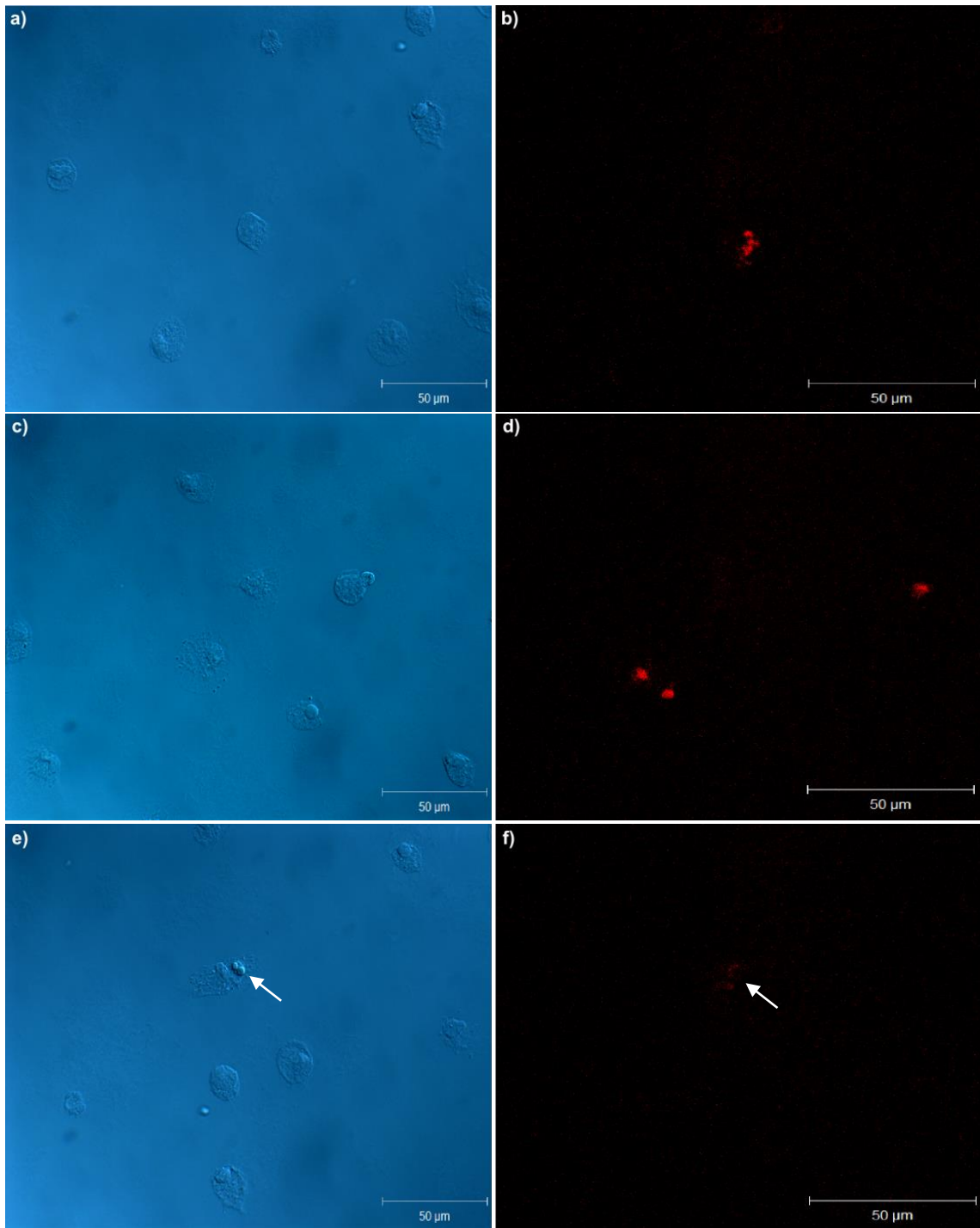


Figura 34. Imagens de DIC (a,c,e) e de fluorescência (b,d,f) das células permeabilizadas e incubadas com os AuNRs funcionalizados com a proteína DENV3E. As setas indicam um provável artefato na imagem e) e sua fluorescência correspondente na imagem f).

VI – Discussão

As nanopartículas de ouro (AuNPs) têm grande potencial em aplicações biomédicas como imagem molecular, terapia fototermal, entrega de genes e drogas, biossensores e vacinas. A maioria dessas aplicações possui como ponto em comum a interação das AuNPs com as células, e isso reforça a importância do estudo a cerca desse tema.

O contato inicial das nanopartículas com as células ocorre através da ligação das AuNPs à membrana citoplasmática. Essa interação pode se dar de diferentes modos devido à influência de uma série de fatores como a presença de ligantes na superfície das AuNPs, seu estado de agregação, e a interação destas com as biomoléculas do meio. Após essa primeira etapa, a membrana citoplasmática promove um tipo específico de endocitose que conseqüentemente culmina em um destino intra ou extracelular (exocitose) específico. Portanto, compreender como as AuNPs são internalizadas, estabelecer quais as vias endocíticas participam desse processo e quais fatores podem alterar o tipo de via são questões essenciais a serem entendidas para que essa ferramenta seja utilizada com a maior eficiência possível.

Por se tratar de uma cultura primária, mais sensível às condições experimentais, os macrófagos murinos (BMDMs) foram avaliados quanto à densidade celular nas placas de cultura e à suplementação ou não de meio com SFB. Esta última variável foi testada porque se buscou analisar a influência da interação entre as proteínas séricas e as AuNPs sobre a endocitose. Quando a condição avaliada foi a densidade celular em meio suplementado com SFB, não houve alterações drásticas da viabilidade celular em nenhuma das quantidades e tempos. Foi notado apenas um aumento da viabilidade no decorrer do tempo, o que possivelmente se deveu à divisão celular e o conseqüente aumento no número de células. Já para a condição de ausência de SFB no meio, a viabilidade celular é comprometida em mais de 50% nos tempos de 24 e 48 h. Nos tempos de 0 e 5 h, a viabilidade permanece próxima dos níveis do controle a partir da densidade de 6×10^4 células/poço (placa de 96 poços). Isso mostra que as células precisam estar em uma quantidade mínima para que fiquem viáveis. Além do teste de viabilidade, a confluência celular também foi levada em conta para a definição da densidade mais adequada. Por atingir uma confluência de aproximadamente 90% em um tempo de 24 h, a densidade de 6×10^4 células/poço foi a escolhida para os

experimentos posteriores, e quando necessário, ajustada para o tamanho de placa utilizada.

O envolvimento das vias endocitose na internalização de partículas, moléculas, microrganismos e afins, é avaliado inibindo-se as respectivas vias de interesse. E essa inibição pode ser feita utilizando-se células expressando formas mutantes de proteínas da via, siRNA (do inglês, *small interfering RNA*) para depleção dessas proteínas, e também drogas inibitórias (DUTTA *et al.*, 2012). Estas últimas são amplamente utilizadas em estudos com nanopartículas (FRANÇA *et al.*, 2011; BARTNECK *et al.*, 2010; REJMAN *et al.*, 2004).

As drogas utilizadas como inibidores podem ser citotóxicas dependendo da concentração e do tempo que as células ficam expostas a elas (ROTHEN-RUTISHAUSER *et al.*, 2013). Por esse motivo, diferentes concentrações das drogas inibitórias utilizadas neste trabalho bem como seu diluente (DMSO) tiveram seus níveis de citotoxicidade avaliados.

Quanto ao diluente, o aumento na concentração de DMSO ocasionou a redução (sequencialmente decrescente) da viabilidade celular, mostrando que as células podem apresentar efeitos adversos a essa substância. Embora isso tenha sido notado, a maior concentração testada (3%) não comprometeu a viabilidade celular em mais que 50%. Sendo assim, a concentração escolhida (1%) para a diluição dos inibidores também não teve grandes efeitos sobre as células mesmo na ausência de SFB.

A escolha das concentrações dos inibidores foi feita com base nos experimentos de viabilidade celular conjuntamente com aquelas observadas em outros trabalhos (FRANÇA *et al.*, 2011; ROTHEN-RUTISHAUSER *et al.*, 2013; TOMIC *et al.*, 2014). Das 4 drogas utilizadas, 3 delas já se mostraram eficientes na inibição da endocitose de AuNPs: a *cytochalasin D* atuando sobre a fagocitose e a *filipin III* bloqueando a internalização via clatrina em macrófagos RAW 264.7 (FRANÇA *et al.*, 2011); e a *dynasore* inibindo a endocitose mediada por clatrina em células dendríticas humanas (TOMIC *et al.*, 2014). Dentre esses inibidores, apenas a *cytochalasin D* apresentou elevado grau de citotoxicidade na maioria das concentrações para o tempo de 5 h em RPMI 0. Por essa razão, o tempo de incubação foi reduzido para 2 h nessas condições experimentais, e assim, manteve-se a viabilidade celular acima dos

50% para todas as concentrações testadas. Os tempos de 2 e 5 h representam 1 h de pré-tratamento com os inibidores (na ausência das AuNPs) somada à 1 ou 4 h de incubação com as nanopartículas. A permanência da inibição durante a incubação com as nanopartículas se deveu ao fato de que a inibição pela droga *dynasore* (inibidor da endocitose via clatrina) é reversível quando esta é retirada do meio (MACIA *et al.*, 2006). Então, para que as condições experimentais fossem semelhantes entre os 4 inibidores, optou-se por manter o inibidor em meio durante a incubação com as AuNPs. Em alguns casos, os testes de citotoxicidade perante os inibidores resultaram em viabilidade celular aumentada em relação às concentrações menores ou mesmo em relação ao controle de células. O teste de MTT, utilizado nos experimentos de citotoxicidade, é baseado na atividade enzimática de desidrogenases mitocondriais (MOSMANN, 1983). Portanto, qualquer efeito que essas drogas tenham tido sobre as células, estimulando a atividade mitocondrial, pode ter causado esse aumento aparente da viabilidade celular. Apesar da ocorrência desse fenômeno, isso não se tornou um empecilho no uso desses inibidores já que o intuito deste experimento foi de apenas verificar se as células se mantinham viáveis (>50%) na presença dos inibidores sob os tempos e condições experimentais testados. Embora esses aumentos de viabilidade possam ter sido causados por uma ativação direta das drogas sobre as células, também há uma vertente, principalmente dentro da área de toxicologia, que reconhece esse fenômeno como sendo um efeito Hormesis. Esse efeito é definido como uma supercompensação por parte das células frente à ruptura da homeostase (CALABRESE *et al.*, 2001). A exposição a pequenas doses de um agente que em altas doses é danoso induz um efeito benéfico adaptativo nas células ou organismos. Essa adaptação é causada pela expressão e ativação de muitas categorias de proteínas resistentes ao estresse como as proteínas *heat-shock*, enzimas antioxidantes e fatores de crescimento (MATTSON, 2008). No entanto, os trabalhos demonstrando o efeito Hormesis submetem primeiramente as células a uma dose baixa do agente tóxico, para indução de uma possível resposta adaptativa de resistência ao composto. Subsequente a isso, as células são expostas a concentrações maiores e variadas do mesmo agente (DAVIES *et al.*, 1995). Essa não foi a forma como os experimentos deste trabalho foram realizados, sendo que desde o pré-

tratamento com os inibidores, as células receberam doses variadas, não havendo um pré-condicionamento celular com uma dose mínima em todos os grupos. O padrão gráfico observado aqui também destoa daquele encontrado em trabalhos cujo objetivo é a identificação do efeito Hormesis. Nesses estudos a viabilidade se mantém nos mesmos níveis do controle celular nas doses mais baixas, atinge o platô nas doses intermediárias, e decresce conforme a dosagem aumenta (DAVIES *et al.*, 1995). Para as drogas inibitórias avaliadas, esse padrão gráfico não é notado, e sim uma oscilação aleatória da viabilidade entre as diferentes concentrações. Portanto, é pouco provável que essas variações se devam ao efeito Hormesis. Além disso, para a confirmação desse fenômeno, é necessário um estudo minucioso considerando diferentes tempos de exposição, números e intervalos de dose adequados a esse objetivo (CALABRESE *et al.*, 2001).

A funcionalização dos AuNRs com a proteína DENV3E foi feita de forma a saturar as regiões disponíveis nas nanopartículas para a ligação da proteína. Neste caso, um *blue-shift* da curva ocasionado pelo aumento da quantidade de proteínas na solução de AuNRs significa a ocorrência da funcionalização. Já um *red-shift* indica que menos proteínas estão se ligando às nanopartículas, e conseqüentemente, a curva tende a se aproximar daquela onde apenas o ácido lipóico estava ligado. O *shift* exprime a variação no índice de refração próximo à superfície das nanopartículas. O índice de refração, por sua vez, descreve como a luz se propaga através do meio. Se o índice de refração próximo à superfície das nanopartículas aumenta, o *shift* caminha em direção a comprimentos de onda maiores (*red-shift*). Se o índice de refração diminui, observa-se o *blue-shift*. Portanto, a ligação do ácido lipóico aos AuNRs promoveu um aumento no índice de refração enquanto que a proteína o diminuiu até certo ponto (0,7 µg de proteína). É plausível que devido ao aumento na quantidade de proteínas, estas passem a interagir entre si ao invés de interagir com as nanopartículas, e dessa forma, o índice de refração fique próximo daquele existente na ligação do ácido lipóico – *red-shift*.

A funcionalização de nanopartículas é muito importante porque além de conferir funcionalidade, ela também as torna biocompatíveis. No caso das AuNPs, a citotoxicidade está relacionada ao CTAB (CONNOR *et al.*, 2005), que após a síntese das nanopartículas atua como agente estabilizante impedindo a

agregação destas. Nanopartículas com a substituição do CTAB (detergente) por ligantes como o polietilenoglicol (PEG) e a fosfatidilcolina têm mostrado alta biocompatibilidade (PISSUWAN *et al.*, 2008; TAKAHASHI *et al.*, 2006). No presente trabalho, tanto os AuNRs puros, contendo CTAB em sua superfície, quanto os funcionalizados com a proteína DENV3E foram testados em diferentes concentrações a fim de se avaliar o impacto sobre a viabilidade celular. Na maior concentração testada, ambos os tipos de AuNPs apresentaram alto grau de citotoxicidade, inviabilizando praticamente todas as células. Isso demonstra que a despeito da funcionalização, uma quantidade excessiva de nanopartículas pode afetar a viabilidade celular. As AuNPs não funcionalizadas mantêm a viabilidade acima de 50% a partir da diluição de 100 vezes em meio suplementado ou não com SFB. Para as partículas funcionalizadas, isso é observado a partir da diluição de 10 vezes. Em um primeiro momento, pode-se pensar que a funcionalização realmente reduziu a citotoxicidade dos AuNRs. Contudo, é válido ressaltar que existem perdas de nanopartículas durante o processo de funcionalização, já que este compreende numerosas etapas de centrifugação (UNCITI-BROCETA *et al.*, 2015). Por isso, os efeitos das diluições não podem ser comparados diretamente intergrupos (funcionalizados com não funcionalizados). Apesar disso, os AuNRs estabilizados em CTAB e o próprio CTAB têm mostrado efeitos negativos drásticos sobre a viabilidade celular quando comparado à mesma concentração de nanopartículas funcionalizadas com ácido poliacrílico (polímero sintético) (ALKILANY *et al.*, 2009). Neste trabalho, o CTAB em concentrações idênticas às aquelas encontradas nas diluições das nanopartículas puras apresentou um perfil gráfico de citotoxicidade muito semelhante ao dessas AuNPs. Esse resultado também já foi encontrado em outros trabalhos (CONNOR *et al.*, 2005). Em conjunto, esses dados demonstram a importância da substituição desse agente estabilizante por outros que sejam biocompatíveis para aplicações *in vivo*. Outro ponto de destaque é o aumento da viabilidade celular, maior que o controle, no experimento envolvendo os AuNRs funcionalizados. A proteína DENV3E foi produzida em sistema procarioto, necessitando assim, que essas células fossem processadas para a sua obtenção. Assim, qualquer resquício de bactéria que tenha ficado com a proteína mesmo após a purificação e que possua a capacidade de estimular a célula, aumentando a

atividade das desidrogenases mitocondriais, pode ter causado esse “aumento de viabilidade”.

No que tange à quantificação de AuNPs, as técnicas utilizadas neste trabalho não proporcionaram resultados satisfatórios para inferências das possíveis vias de endocitose envolvidas na internalização das nanopartículas. A microscopia eletrônica forneceu imagens com grande detalhamento, sendo possível contar as nanopartículas uma a uma. Por outro lado, a variação da quantidade de AuNPs entre as células foi muito alta. Com isso, não houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre o grupo controle e o tratado com o inibidor de fagocitose/macropinocitose. Trabalhos de quantificação de nanopartículas através de TEM utilizam múltiplas secções de uma mesma amostra (ELSAESSER *et al.*, 2011; ROTHEN-RUTISHAUSER *et al.*, 2013, BRANDENBERGER *et al.*, 2010), já que uma única secção representa uma ínfima parte do todo. No presente estudo, a quantidade de combinações das variáveis experimentais (presença e ausência de SFB, tempos de 1 e 4 h, AuNRs funcionalizados ou não, 4 inibidores de endocitose) impossibilitou a abordagem de múltiplas secções porque seria muito laborioso, demandaria uma enorme quantidade de tempo e teria um alto custo devido a preparação das amostras e a utilização do microscópio. Apesar de não ter sido possível identificar as vias de internalização, é plausível supor que as AuNPs penetrem as células utilizando essas vias, e não de forma passiva através da membrana, considerando que as nanopartículas internalizadas foram encontradas predominantemente no interior de vesículas. A menos que as AuNPs sejam engenheiradas (cobertas com ligantes hidrofóbicos e aniônicos arranjados em domínios de composição alternada) para o transporte passivo (VERMA *et al.*, 2008), é pouco provável que este ocorra (BANERJI *et al.*, 2007). E diversos outros trabalhos mostram a predominância das AuNPs internalizadas no interior de vesículas (ELSAESSER *et al.*, 2011; BRANDENBERGER *et al.*, 2010). Os AuNRs (não funcionalizados) encontrados em número maior que um no interior de vesículas estavam, em sua grande maioria, agregados. Nanopartículas de ouro (estabilizadas em citrato) quando adicionadas em meio RPMI 1640 (sem soro) formam grandes aglomerados além de serem encontradas em números maiores de agregados no interior das células em relação às AuNPs funcionalizadas com PEG (BRANDENBERGER *et al.*, 2010).

Essa agregação pode ser que devido às AuNPs não estarem funcionalizadas, elas interajam e se ligam a mais proteínas e outros metabólitos presentes no meio se comparadas às AuNPs funcionalizadas com PEG (WALKEY *et al.*, 2011). Por sua vez, as biomoléculas do meio estão relacionadas com a agregação de nanopartículas (ALBANESE *et al.*, 2014).

A quantificação das AuNPs por citometria de fluxo foi experimentada apenas para as AuNPs funcionalizadas, tendo em vista que não é possível utilizar essa abordagem em nanopartículas puras por não haver um alvo para os anticorpos de marcação. A marcação das células e sua observação ao microscópio mostrou-se aparentemente funcionando, onde apenas as células incubadas com a proteína DENV3E ou com os AuNRs funcionalizados com a mesma apresentaram fluorescência. Baseada nas imagens derivadas da microscopia, a fluorescência do grupo tratado com as nanopartículas funcionalizadas se mostrou mais intensa que nos demais. Na citometria de fluxo, o grupo controle de células, quando submetido à marcação com os anticorpos primários e secundários, teve maior intensidade de fluorescência em relação ao mesmo grupo não incubado com os anticorpos. Na microscopia de fluorescência, essa possível ligação inespecífica dos anticorpos não foi notada. Por ser mais sensível que a observação das imagens a olho nu, a citometria de fluxo pode indicar a ocorrência de marcação inespecífica. Considerando ainda a fluorescência do grupo incubado com os AuNRs puros (também submetido à marcação com os anticorpos) em relação ao controle não marcado, é possível reforçar a ideia de ligação inespecífica já que a proteína DENV3E não estava presente no meio. Embora possa ter havido essa inespecificidade, nos grupos incubados com a proteína ou com os AuNRs funcionalizados, o sinal de fluorescência foi maior que nos outros grupos. O grupo incubado com as nanopartículas funcionalizadas teve um aumento na endocitose quando tratado com o inibidor de fagocitose/macropinocitose. Esse fenômeno foi inesperado, pois se imaginava uma redução, ou caso essa via não estivesse envolvida com a internalização das AuNPs, que a fluorescência se fosse semelhante entre os grupos inibido ou não. Entretanto, é válido pensar que a inibição de uma via pode estimular a endocitose por outra via mais eficiente. Esse fenômeno de aumento da internalização de AuNPs já foi observado para a inibição da endocitose mediada por clatrina (ROTHEN-RUTISHAUSER *et al.*, 2013). No

caso da proteína DENV3E pura, o tratamento com o inibidor de fagocitose/macropinocitose diminuiu sua internalização. Diferentemente da proteína conjugada aos AuNRs, ela pura não parece desencadear um mecanismo de endocitose alternativo à fagocitose/macropinocitose que seja mais eficiente. Embora essas conclusões tenham sido feitas, é necessário ressaltar, sendo que o experimento foi realizado em simplicatas e existe a possibilidade de ligação inespecífica dos anticorpos. Por fim, a fluorescência foi mais acentuada no grupo dos AuNRs funcionalizados com a proteína DENV3E do que no grupo incubado com a proteína. Isso corrobora o que foi visto na microscopia de fluorescência e permite inferir que as nanopartículas podem carrear maior quantidade de proteínas para o interior das células se comparadas à proteína pura. Embora a citometria de fluxo seja utilizada em muitos estudos de quantificação de nanopartículas (GOTTSTEIN *et al.*, 2013; RODRIGUEZ-LORENZO *et al.*, 2014), ela sozinha não é capaz de diferenciar o que realmente está no interior das células daquilo que está aderido à parte externa da membrana citoplasmática. Por isso, técnicas de microscopia acabam sendo necessárias para complementar essa informação.

A quantificação através da O.D. forneceu dados imprecisos quanto à internalização das nanopartículas frente ao tratamento com os inibidores de endocitose. Ainda que não tenha sido encontrado na literatura o uso dessa técnica para a quantificação de nanopartículas internalizadas, ela foi usada para a quantificação em solução aquosa (UNCITI-BROCETA *et al.*, 2015). Em um primeiro momento, a fim de avaliar se essa quantificação também era possível em meio de cultura, diferentes diluições dos AuNRs foram feitas em DMEM e tiveram sua O.D. aferida. Os valores obtidos se encaixaram perfeitamente em um modelo de regressão linear ($R^2 = 0,9962$), possibilitando o seguimento dos experimentos para a quantificação de nanopartículas endocitadas. A incubação das células com os AuNRs puros e o tratamento com os diferentes inibidores resultaram em dados não muito claros. A inibição das vias de endocitose mediada por clatrina e de macropinocitose tiveram valores de O.D. abaixo do controle de células, sendo consideradas, portanto, como não participantes da internalização dos AuNRs. Embora a inibição da endocitose por clatrina não tenha sido observada, o envolvimento dessa via na internalização de AuNPs nesse mesmo tipo celular (macrófagos RAW 264.7) já

foi confirmado utilizando um inibidor diferente (*chlorpromazine hydrochloride*) (FRANÇA *et al.*, 2011). Da mesma forma, a macropinocitose também já se mostrou atuante na endocitose de AuNPs em células de epitélio alveolar humano A549 (ROTHEN-RUTISHAUSER *et al.*, 2013; BRANDENBERGER *et al.*, 2010) e em macrófagos primários humanos (BARTNECK *et al.*, 2010). O bloqueio da endocitose via caveolina, surpreendentemente, causou um aumento de 67% na internalização das nanopartículas. No entanto, a inibição dessa via é frequentemente relacionada com a redução da endocitose de AuNPs (ROTHEN-RUTISHAUSER *et al.*, 2013; FRANÇA *et al.*, 2011; BRANDENBERGER *et al.*, 2010). Quanto à fagocitose, esta teve sua taxa reduzida em 67% quando as células foram tratadas com a *cytochalasin D*, em acordo com os achados em outro estudo para o mesmo tipo celular (FRANÇA *et al.*, 2011) e em monócitos humanos THP-1 (GARCÍA *et al.*, 2013). É importante destacar que este inibidor impede a polimerização do citoesqueleto de actina, e devido a isso, ele também pode agir sobre a macropinocitose – dependente de citoesqueleto (DUTTA *et al.*, 2011). Comparando esses dados de inibição da fagocitose com aqueles encontrados na quantificação através de citometria de fluxo e de TEM, é possível conjecturar que a funcionalização diminui a interação da superfície das AuNPs com as biomoléculas do meio, e isso influencia a via de endocitose pela qual a nanopartícula é internalizada. No caso da quantificação por citometria de fluxo, os AuNRs estavam funcionalizados com a proteína DENV3E e a inibição da fagocitose aumentou sua taxa de internalização. Na quantificação através da O.D. e por TEM, em que os AuNRs estavam puros, a inibição dessa mesma via reduziu sua quantidade endocitada. Por não estarem funcionalizadas, essas nanopartículas interagem com uma quantidade muito maior de proteínas séricas (WALKEY *et al.*, 2011). Devido a essa interação, as AuNPs formam agregados que não são observados para as nanopartículas funcionalizadas (BARTNECK *et al.*, 2010). Dependendo do tamanho desses agregados e levando em conta que a fagocitose e possivelmente a macropinocitose, vias capazes de internalizar particulados acima de 1 μm (CONNER *et al.*, 2003), estão bloqueadas, os mecanismos alternativos de endocitose por clatrina e caveolina não suprem essa internalização por formarem vesículas com tamanho de aproximadamente 120 e 60 nm, respectivamente (CONNER *et al.*, 2003). Portanto, a quantidade

de AuNRs puros endocitados (provavelmente aglomerados) é reduzida quando a fagocitose/macropinocitose é inibida. Por outro lado, o bloqueio dessa via é compensado por outras no caso das AuNPs funcionalizadas, uma vez que estas não formam grandes agregados. Comparando os valores de O.D. do sobrenadante com os respectivos grupos lisados, é notável que a maior parte das nanopartículas não foi internalizada durante o tempo avaliado (4 h), possivelmente devido à capacidade endocítica dessas células. Embora essas asserções sejam levantadas, não é possível afirmar categoricamente sua veracidade. Muitos pontos como a agregação ou não das nanopartículas em meio precisam ser mostrados, e técnicas sensíveis e precisas de quantificação necessitam ser estabelecidas. A quantificação pela O.D. se mostrou adequada quando os AuNRs foram diluídos em meio de cultura. Entretanto, ela não foi apropriada para a quantificação das nanopartículas internalizadas, dado o grande desvio-padrão observado. A presença dos *debris* celulares pôde, provavelmente, ter sido a causa dessa variação.

No que tange às técnicas de maior sensibilidade para quantificação das nanopartículas, a microscopia de fluorescência pareceu ser uma técnica adequada a esse propósito, como já utilizada em outros trabalhos (LI *et al.*, 2014; TOMIC *et al.*, 2014). Os controles não exibiram qualquer tipo de fluorescência, sendo esta detectada apenas nas células incubadas com os AuNRs funcionalizados com a proteína DENV3E. As células não permeabilizadas, utilizadas para se diferenciar o conteúdo endocitado daquele apenas aderido externamente à membrana, apresentaram baixa intensidade de fluorescência. Devido a isso, seu sinal não pôde ser captado pelo *laser*, sendo visto apenas através da observação direta ao microscópio. Provavelmente, a quantidade de AuNPs que permaneceram aderidas à membrana foi muito baixa, não contribuindo, dessa forma, para uma fluorescência de alta intensidade. Por outro lado, nas células permeabilizadas, o grau de fluorescência foi elevado, destacando o potencial dessa técnica para quantificação das AuNPs. Contudo, sinais de fluorescência também foram captados de prováveis artefatos. Por esse motivo, as análises das imagens devem ser feitas com cautela. Outro fato importante foi o de que a fluorescência não estava presente em todas as células. Isso pode ser devido às características intrínsecas do próprio experimento. Como esses testes são

feitos em placas de cultura, uma vez que as AuNPs são inoculadas no meio, não existe nenhum processo que garanta a homodispersão e a distribuição equitativa das nanopartículas pelas células. Com isso, é esperado que nem todas as células apresentem fluorescência derivada das nanopartículas internalizadas. Por fim, as células incubadas com os AuNRs tiveram sua morfologia alterada, passando da forma estrelada, característica de macrófagos, para um aspecto globular. A provável causa desse fato foi a quantidade de nanopartículas utilizadas. Pelos testes de citotoxicidade, a quantidade ideal seria de 30 μL de nanopartículas. No entanto, como se tratava de um experimento piloto para verificar o potencial uso da técnica de microscopia confocal, essa quantidade foi aumentada para 100 μL . Embora a morfologia tenha sido alterada, as células se mantiveram aderidas às lamínulas (viáveis).

VII – Conclusões e perspectivas

Em termos gerais, as AuNPs, funcionalizadas ou não, são internalizadas através das vias endocíticas. A predominância de uma determinada via depende de diversos fatores, dentre eles, a interação da superfície das AuNPs com as biomoléculas do meio que pode promover a agregação dessas nanopartículas. Por sua vez, a funcionalização influencia diretamente essa interação, e com isso, pode alterar a via de internalização de uma nanopartícula não funcionalizada a partir do momento em que esta passa a ser um bioconjugado. A participação das diferentes vias de endocitose é estudada através do uso de técnicas inibitórias específicas acompanhadas pela quantificação das nanopartículas internalizadas. Essas técnicas apresentam vantagens e desvantagens, sendo por este motivo, utilizadas em associação umas com as outras, a fim de suprir as lacunas existentes em cada uma. Neste estudo, as técnicas utilizadas não forneceram resultados robustos que pudessem fundamentar inferências confiáveis. Entretanto, foram gerados indícios que condizem com a literatura dessa área de estudo. Ao final, a microscopia confocal pareceu ser a técnica mais adequada para as análises pretendidas, cabendo agora ser utilizada nos experimentos de inibição da endocitose para se avaliar a sensibilidade desta técnica frente às possíveis variações na quantidade de AuNPs funcionalizadas internalizadas. A tabela 2, abaixo, resume as conclusões possíveis obtidas neste estudo e também salientam futuros experimentos que deverão ser feitos para solidificar e ampliar as conclusões possíveis.

Tabela 2. Conclusões e perspectivas do trabalho.

Experimento	Resultados	Conclusão Parcial	Experimentos Futuros
Avaliação das vias de internalização através de microscopia eletrônica de transmissão.	Os AuNRs foram encontrados em vesículas, e em pequenas quantidades, dentro de células tratadas ou não com inibidor de fagocitose.	Apesar de não haver diferença significativa na quantidade de nanopartículas endocitadas quando a fagocitose foi inibida, este número foi menor em relação ao controle.	Repetir o experimento com AuNRs funcionalizados, na presença ou não de proteínas séricas e com inibidores de outras vias. Verificar a inibição das vias na concentração utilizada dos inibidores através de controles positivos.
Avaliação das vias de internalização através de citometria de fluxo.	As células incubadas com os AuNRs funcionalizados com a proteína DENV3E apresentaram maior intensidade de fluorescência do que aquelas incubadas apenas com a proteína. O inibidor de fagocitose causou efeitos diferentes nesses dois grupos.	A proteína DENV3E sozinha foi internalizada em menor quantidade e por via diferente daquela utilizada para esta mesma proteína ligada aos AuNRs.	Repetir o experimento em replicata, na presença ou ausência de proteínas séricas e com inibidores de outras vias. Verificar a inibição das vias na concentração utilizada dos inibidores através de controles positivos.
Avaliação das vias de internalização através de densidade óptica.	As células incubadas com os AuNRs puros apresentaram variações na quantidade de nanopartículas internalizadas na presença dos inibidores de fagocitose e de endocitose via caveolina.	Enquanto a inibição da fagocitose reduziu a quantidade de nanopartículas internalizadas, a inibição da endocitose mediada por caveolina aumentou esta quantidade.	Repetir o experimento com AuNRs funcionalizados e na presença ou não de proteínas séricas. Verificar a inibição das vias na concentração utilizada dos inibidores através de controles positivos.
Avaliação das vias de internalização através de microscopia confocal.	As células incubadas com os AuNRs funcionalizados com a proteína DENV3E apresentaram elevada intensidade de fluorescência em relação aos controles.	Esta técnica, possivelmente, permitiu identificar os AuNRs funcionalizados com a proteína DENV3E no interior das células.	Repetir o experimento na presença ou ausência de proteínas séricas e com inibidores das vias endocitoses. Verificar a inibição das vias na concentração utilizada dos inibidores através de controles positivos.

VIII – Referências Bibliográficas

ACKERSON, C. J.; JADZINSKY, P. D.; JENSEN, G. J.; KORNBERG, R. D. Rigid, specific, and discrete gold nanoparticle/antibody conjugates. **J. Am. Chem. Soc.**, vol. 128, n° 8, 2635-2640, 2006.

ADEREM, A.; UNDERHILL, D. M. Mechanisms of Phagocytosis in Macrophages. **Annual Review of Immunology**, vol. 17, 593-623, 1999.

ALBANESE, A.; WALKEY, C. D.; OLSEN, J. B. *et al.* Secreted Biomolecules Alter the Biological Identity and Cellular Interactions of Nanoparticles. **ACS Nano**, vol. 8, n° 6, 5515–5526, 2014.

ALKILANY, A. M.; NAGARIA, P. K.; HEXEL, C. R. *et al.* Cellular Uptake and Cytotoxicity of Gold Nanorods: Molecular Origin of Cytotoxicity and Surface Effects. **Small**, vol. 5, N° 6, 701–708, 2009.

AUBIN-TAM, M.-E.; HAMAD-SCHIFFERLI, K. Gold Nanoparticle–Cytochrome c Complexes: The Effect of Nanoparticle Ligand Charge on Protein Structure. **Langmuir**, vol. 21, n° 26, 12080–12084, 2005.

AUBIN-TAM, M. E.; HAMAD-SCHIFFERLI, K. Structure and function of nanoparticle-protein conjugates. **Biomed. Mater.**, vol. 3, n° 3, 2008.

BANERJI, S. K.; HAYES, M. A. Examination of Nonendocytotic Bulk Transport of Nanoparticles Across Phospholipid Membranes. **Langmuir**, vol. 23, n° 6, 3305–3313, 2007.

BARTNECK, M.; KEUL, H. A.; SINGH, S. *et al.* Rapid Uptake of Gold Nanorods by Primary Human Blood Phagocytes and Immunomodulatory Effects of Surface Chemistry. **ACS Nano**, vol. 4, n° 6, 3073–3086, 2010.

BRANDENBERGER, C.; MUHLFELD, C.; ALI, Z. *et al.* Quantitative Evaluation of Cellular Uptake and Trafficking of Plain and Polyethylene Glycol-Coated Gold Nanoparticles. **Small**, vol. 6, N° 15, 1669–1678, 2010.

CAI, W.; GAO, T.; HONG, H.; SUN, J. Applications of Gold Nanoparticles in Cancer Nanotechnology. **Nanotechnology, Science and Applications**, 2008.

CALABRESE, E. J.; BALDWIN, L. A. Hormesis: A Generalizable and Unifying Hypothesis. **Critical Reviews in Toxicology**, vol. 31, n° 4 & 5, 353–424, 2001.

CHEN, C. C.; LIN, Y. P.; WANG, C. W, *et al.* DNA-gold nanorod conjugates for remote control of localized gene expression by near infrared irradiation. **Journal of the American Chemical Society**, vol. 128, n° 11, 3709–3715, 2006.

CHENG, X.; TIAN, X.; WU, A.; *et al.* Protein Corona Influences Cellular Uptake of Gold Nanoparticles by Phagocytic and Nonphagocytic Cells in a Size-Dependent Manner. **ACS Appl. Mater. Interfaces**, vol. 7, n° 37, 20568–20575, 2015.

CHO, E. C.; XIE, J.; WURM, P. A.; XIA, Y. Understanding the Role of Surface Charges in Cellular Adsorption versus Internalization by Selectively Removing Gold Nanoparticles on the Cell Surface with a I2/KI Etchant. **Nano Lett.**, vol. 9, n° 3, 1080–1084, 2009.

CHOU, L. Y. T.; MINGA, K.; CHAN, W. C. W. Strategies for the intracellular delivery of nanoparticles. **Chem. Soc. Rev.**, vol. 40, n° 1, 233–245, 2011.

CLYDE, K.; KYLE, J. L.; HARRIS, E. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. **J Virol**, vol. 80, n° 23, 11418-31, 2006.

CONNER, S. D.; SCHMID, S. L. Regulated portals of entry into the cell. **Nature**, vol. 422, 37-44, 2003.

CONNOR, E. E.; MWAMUKA, J.; GOLE, A.; MURPHY, C. J.; WYATT, M. D. Gold Nanoparticles Are Taken Up by Human Cells but Do Not Cause Acute Cytotoxicity. **Small**, vol. 1, n° 3, 325-327, 2005.

COPLAND, J. A., EGHTEHARI, M., POPOV, V. L. *et al.* Bioconjugated gold nanoparticles as a molecular based contrast agent: implications for imaging of deep tumors using optoacoustic tomography. **Molecular Imaging and Biology**, vol. 6, n° 5, 341-349, 2004.

DAVIES, J.M.S.; LOWRY, C.V.; DAVIES, K.J.A. Transient adaptation to oxidative stressing yeast. **Arch. Biochem. Biophys.**, vol. 317, n° 1, 1–6, 1995.

DOBROVOLSKAIA, M. A.; PATRI, A. K.; ZHENG, J.; *et al.* Interaction of colloidal gold nanoparticles with human blood: effects on particle size and analysis of plasma protein binding profiles. **Nanomedicine**, vol. 5, n° 2, 106–117, 2009.

DOHERTY, G. J.; MCMAHON, H. T. Mechanisms of Endocytosis. **Annual Review of Biochemistry**, vol. 78, 857–902, 2009.

DREADEN, E. C.; ALKILANY, A. M.; HUANG, X.; MURPHY, C. J.; EL-SAYED, M. A. The golden age: gold nanoparticles for biomedicine. **Chem. Soc. Rev.**, vol. 41, 2740-2779, 2012.

DYKMAN, L. A.; KHLEBTSOV N. G. Uptake of Engineered Gold Nanoparticles into Mammalian Cells. **Chem. Rev.**, vol. 114, n° 2, 1258–1288, 2014.

DUTTA, D.; DONALDSON, J. G. Search for inhibitors of endocytosis - intended specificity and unintended consequences. **Cell Logist.**, vol. 2, n° 4, 203–208, 2012.

EL-SAYED, M. A. Some Interesting Properties of Metals Confined in Time and Nanometer Space of Different Shapes. **Acc. Chem. Res.**, vol. 34, n° 4, 257–264, 2001.

ELSAESSER, A.; BARNES, C. A.; MCKERR, G. *et al.* Quantification of nanoparticle uptake by cells using an unbiased sampling method and electron microscopy. **Nanomedicine**, vol. 6, N° 7, 1189-1198, 2011.

FRANÇA, A.; AGGARWAL, P.; BARSOV, E. V. *et al.* Macrophage scavenger receptor A mediates the uptake of gold colloids by macrophages *in vitro*. **Nanomedicine**, vol. 6, n° 7, 1175-1188, 2011.

GARCÍA, C. P.; SUMBAYEV, V.; GILLILAND, D. *et al.* Microscopic Analysis of the Interaction of Gold Nanoparticles with Cells of the Innate Immune System. **Sci. Rep.**, vol. 3, 1326, 2013.

GOODRICH, G. P.; BAO, L.; GILL-SHARP, K. *et al.* Photothermal therapy in a murine colon cancer model using near-infrared absorbing gold nanorods. **Journal of Biomedical Optics**, vol. 15, n° 1, 2010.

GOTTSTEIN, C.; WU, G.; WONG, B. J.; ZASADZINSKI, J. A. Precise Quantification of Nanoparticle Internalization. **ACS Nano.**, vol. 7, n° 6, 4933–4945, 2013.

HA, S., CARSON, A., AGARWAL, A., KOTOV, N. A. KIM, K. Detection and monitoring of the multiple inflammatory responses by photoacoustic molecular imaging using selectively targeted gold nanorods. **Biomedical Optics Express**, vol. 2, n° 3, 645-657, 2011.

HAUCK, T. S.; GHAZANI, A. A.; CHAN, W. C. Assessing the effect of surface chemistry on gold nanorod uptake, toxicity, and gene expression in mammalian cells. **Small**, vol. 4, n° 1, 153-159, 2008.

HUANG, X.; EL-SAYED, I. H.; QIAN, W.; EL-SAYED, M. A. Cancer cell imaging and photothermal therapy in the near-infrared region by using gold nanorods. **Journal of the American Chemical Society**, vol. 128, n° 6, 2115-2120, 2006.

HUANG, X.; NERETINA, S.; EL-SAYED, M. A. Gold Nanorods: From Synthesis and Properties to Biological and Biomedical Applications. **Advanced Materials**, vol. 21, n° 48, 4880-4910, 2009.

HUDLIKAR, M. S.; LI, X.; GAGARINOV, I. A. *et al.* Controlled Multifunctionalization Facilitates Targeted Delivery of Nanoparticles to Cancer Cells. **Chemistry**, vol. 22, n° 4, 1415-1423, 2016.

HUSSAIN, K. M.; LEONG, K. L.; NG, M. M.; CHU, J. J. The essential role of clathrin-mediated endocytosis in the infectious entry of human enterovirus 71. **J Biol Chem.**, vol. 286, n° 1, 309-321, 2011.

IOSIN, M.; TODERAS, F.; BALDECK, P.L.; ASTILEAN, S. Study of protein–gold nanoparticle conjugates by fluorescence and surface-enhanced Raman scattering. **Journal of Molecular Structure**, vol. 924-926, 196-200, 2009.

JIANG, Y.; HUO, S.; MIZUHARA, T. *et al.* The Interplay of Size and Surface Functionality on the Cellular Uptake of Sub-10 nm Gold Nanoparticles. **ACS Nano**, vol. 9, n° 10, 9986–9993, 2015.

JIANG, K.; SCHADLER, L. S.; SIEGEL, R. W. *et al.* Protein immobilization on carbon nanotubes via a two-step process of diimide-activated amidation. **J. Mater. Chem.**, vol. 14, 37-39, 2004.

JOHNSON, C. J.; DUJARDIN, E.; DAVIS, S. A.; MURPHY, C. J.; MANN, S. Growth and form of gold nanorods prepared by seed-mediated, surfactant-directed synthesis. **J. Mater. Chem.**, 12, 1765-1770. 2002.

KELLY, K. L.; CORONADO, E.; ZHAO, L. L.; SCHATZ, G. C. The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment. **J Phys Chem B**, vol. 107, n° 3, 668–677, 2003.

LI, K.; SCHNEIDER, M. Quantitative evaluation and visualization of size effect on cellular uptake of gold nanoparticles by multiphoton imaging-UV/Vis spectroscopic analysis. **Journal of Biomedical Optics**, vol. 19, n° 10, 2014.

MACIA, E.; EHRLICH, M.; MASSOL, R. *et al.* Dynasore, a Cell-Permeable Inhibitor of Dynamin. **Developmental Cell**, vol. 10, n° 6, 839–850, 2006.

MAHMOUDI, M.; LYNCH, I.; EJTEHADI, M. R. *et al.* Protein–Nanoparticle Interactions: Opportunities and Challenges. **Chem. Rev.**, vol. 111, n° 9, 5610–5637, 2011.

MATTSON, M. P. Hormesis Defined. **Ageing Res Rev.**, vol. 7, n° 1, 1–7, 2008.

MELLMAN, I.; STEINMAN, R. M. Dendritic Cells: Specialized and Regulated Antigen Processing Machines. **Cell**, vol. 106, n° 3, 255-258, 2001.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, vol. 65, n° 1–2, 55-63, 1983.

NAGASAWA, S.; OGURA, K.; TSUTSUKI, H. *et al.* Uptake of Shiga-toxicogenic Escherichia coli SubAB by HeLa cells requires an actin- and lipid raft-dependent pathway. **Cell Microbiol.**, vol. 16, n° 10, 1582-1601, 2014.

NEL, ANDRE E.; MÄDLER, L. VELEGOL, D. *et al.* Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface. **Nature Materials**, vol. 8, 543-557, 2009.

NIIDOMEA, T.; YAMAGATAA, M.; OKAMOTOA, Y. *et al.* PEG-modified gold nanorods with a stealth character for in vivo applications. **Journal of Controlled Release**, vol. 114, n° 3, 343–347, 2006.

PÉREZ-JUSTE, J.; PARTORIZA-SANTOS, I.; LIZ-MARZÁN, L. M.; MULVANEY, P. Gold Nanorods: Synthesis, Characterization and Applications. **Coordination Chemistry Reviews**, vol. 249, n° 17-18, 1870-1901, 2005.

PISSUWAN, D.; VALENZUELA, S. M.; CORTIE, M. B. Prospects for Gold Nanorod Particles in Diagnostic and Therapeutic Applications. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, vol. 25, 93-112, 2008.

PISSUWAN, D.; VALENZUELA, S. M.; KILLINGSWORTH, M. C.; XU, X.; CORTIE M. B. Targeted destruction of murine macrophage cells with bioconjugated gold nanorods. **Journal of Nanoparticle Research**, vol. 9, 1109, 2007.

QIU, Y.; LIU, Y.; WANG, L. *et al.* Surface chemistry and aspect ratio mediated cellular uptake of Au nanorods. **Biomaterials**, vol. 31, n° 30, 7606–7619, 2010.

REJMAN, J.; OBERLE, V.; ZUHORN, I. S.; HOEKSTRA, D. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. **Biochem J.**, vol. 377, 159-169, 2004.

RODRIGUEZ-LORENZO, L.; FYTIANOS, K.; BLANK, F. *et al.* Fluorescence-Encoded Gold Nanoparticles: Library Design and Modulation of Cellular Uptake into Dendritic Cells. **Small**, vol. 10, n° 7, 1341–1350, 2014.

ROTHEN-RUTISHAUSER, B.; KUHN, D. A.; ALI, Z. *et al.* Quantification of gold nanoparticle cell uptake under controlled biological conditions and adequate resolution. **Nanomedicine**, vol. 9, n° 5, 607-621, 2013.

SALEM, A. K.; PEARCE, M. E.; MELANKO, J. B. Multifunctional Nanorods for Biomedical Applications. **Pharmaceutical Research**, vol. 24, n° 12, 2335-2352, 2007.

STIASNY, K.; HEINZ, F. X. Flavivirus membrane fusion. **J Gen Virol**, vol. 87, 2755-2766, 2006.

STONE, J.; JACKSON, S.; WRIGHT, D. Biological applications of gold nanorods. **WIREs Nanomed Nanobiotechnol**, vol. 3, n° 1, 100-109, 2011.

STONE, J.; THORNBURG, N. J.; BLUM, D. L. *et al.* Gold nanorod vaccine for respiratory syncytial virus. **Nanotechnology**, vol. 24, n° 29, 2013.

TAKAHASHI, H.; NIIDOME, Y.; NIIDOME, T. *et al.* Modification of Gold Nanorods Using Phosphatidylcholine to Reduce Cytotoxicity. **Langmuir**, vol. 22, n° 1, 2-5, 2006.

TANG, L.; CASAS, J. Quantification of cardiac biomarkers using label-free and multiplexed gold nanorod bioprobes for myocardial infarction diagnosis. **Biosensors and Bioelectronics**, vol. 61, 70-75, 2014.

TOMIC, S.; ĐOKIC, J.; VASILIJIC, S. *et al.* Size-Dependent Effects of Gold Nanoparticles Uptake on Maturation and Antitumor Functions of Human Dendritic Cells In Vitro. **PLOS ONE**, vol. 9, n° 5, 2014.

UNCITI-BROCETA, J. D.; CANO-CORTÉS, V.; ALTEA-MANZANO, P. *et al.* Number of Nanoparticles per Cell through a Spectrophotometric Method - A key parameter to Assess Nanoparticle-based Cellular Assays. **Scientific Reports**, vol. 5, 2015.

VERMA, A.; UZUN, O.; HU, Y. *et al.* Surface-structure-regulated cell-membrane penetration by monolayer-protected nanoparticles. **Nature Materials**, vol. 7, 588–595, 2008.

VERSIANI, A. F. Utilização da Tecnologia de Nanobastões de Ouro para Geração de um Protótipo Vacinal Contra Dengue Vírus 3. Departamento de Microbiologia, UFMG, Belo Horizonte/MG, 2014.

WALKEY, C. D.; OLSEN, J. B.; GUO, H. *et al.* Nanoparticle Size and Surface Chemistry Determine Serum Protein Adsorption and Macrophage Uptake. **J. Am. Chem. Soc.**, vol. 134, n° 4, 2139–2147, 2011.

WANG, S.; MAMEDOVA, N.; KOTOV, N. A.; CHEN, W.; STUDER, J. Antigen/antibody immunocomplex from CdTe nanoparticle bioconjugates. **Nano Letters**, vol. 2, n°8, 817–822, 2002.

WEI, Q.; JI, J.; SHEN, J. Synthesis of near-infrared responsive gold nanorod/PNIPAAm core/shell nanohybrids via surface initiated ATRP for smart drug delivery. **Macromol. Rapid Commun.**, vol. 29, 645–650, 2008.

WEISSLEDER, R. A Clearer Vision for in Vivo Imaging. **Nature Biotechnology**, vol. 19, 316–317, 2001.

YEN, H.-J.; HSU, S.-H.; TSAI C.-L. Cytotoxicity and Immunological Response of Gold and Silver Nanoparticles of Different Sizes. **Small**, vol. 5, n° 13, 1553–1561, 2009.

YU, C.; NAKSHATRI, H.; IRUDAYARAJ, J. Identity Profiling of Cell Surface Markers by Multiplex Gold Nanorod Probes. **Nano Lett.**, vol. 7, n° 8, 2300–2306, 2007.

ZELLWEGER, R. M.; MILLER, R.; EDDY, W. E.; WHITE, L. J.; JOHNSTON, R. E.; SHRESTA, S. Role of Humoral versus Cellular Responses Induced by a Protective Dengue Vaccine Candidate. **PLoS Pathog**, vol. 9, n° 10, 2013.

ZUEST, R.; VALDES, I.; SKIBINSKI, D. *et al.* Tetravalent dengue DIIC protein together with alum and ODN elicits a Th1 response and neutralizing antibodies in mice. **Vaccine**, vol. 33, 1474–1482, 2015.

IX – Anexos

Anexo I

NANOPARTZ™

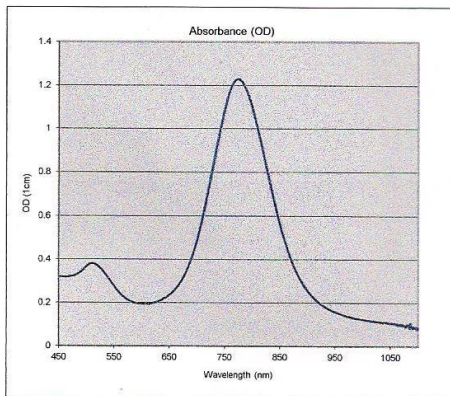
The gold nanoparticle for nanotechnology

Certificate of Analysis

Product Family	Nanopartz Gold Nanorod			
Product Number	A12-10-780-CTAB			
Lot #	RPD250D			
Form	Gold Colloid			
Capping Agent	CTAB			
Solution	18MEG DI Water			
SPR Peak	nm	measured	UV/VIS	780
SPR Abs	AU	measured	UV/VIS	1.1
LSPR Peak	nm	measured	UV/VIS	511
LSPR Abs	AU	measured	UV/VIS	0.3
pH		measured	Expt.	7
Zeta Potential	mV	measured	DLS	38
Diameter	nm	measured	TEM	10
Length	nm	measured	TEM	38
Aspect Ratio		calc		3.8
Concentration	nps/mL	calc		7.4E+11
Concentration	mg/mL	calc		0.039
CTAB	mM	measured		3

Date 6/24/2015
Exp Date 12/21/2015

Alex Schoen, Manager Quality Control



Anexo II



Nanopartz Endotoxin Purification

Nanopartz uses a Thermo Scientific Barnstead Nanopure TOC Life Science (UV/UF with TOC) water system. This ensures that the water we use in our products conforms to:

- Resistivity > 18.0 mΩ-cm
- TOC Less than 3.0 ppb +/- 1 ppb
- Endotoxin Less than 0.02 Eu/mL

As per our ISO testing, monthly we test sterility and endotoxin. For our sterility tests we measure for:

- Trichophyton mentagrophytes
- Candida albicans
- Aspergillus niger
- Candida albicans
- Escherichia coli
- Staphylococcus aureus
- Candida krusei
- Chloramphenicol, Gentamicin
- Beta-streptococci
- Groups A.B.C.F.G
- Enterococci
 - Non enterococci
- Listeria species:
- Haemophilus species:
- H. influenzae
- H. parainfluenzae
- H. haemolyticus
- H. parahaemolyticus
- Escherichia coli
- Salmonella species
- Shigella species
- Proteus species
- Enterobacter species
- Pseudomonas species

For our endotoxin tests, we use an LM-132 Kinetic Endotoxin test.

Results of Test: **PASSED**

6/24/15 RPD250D

Anexo III



Nanopartz Sterilization Test Includes:

Trichophyton mentagrophytes

Candida albicans

Aspergillus niger

Candida albicans

Escherichia coli

Staphylococcus aureus

Candida krusei

Chloramphenicol, Gentamicin

Beta-streptococci

Groups A.B.C.F.G

Enterococci

Non enterococci

Listeria species:

Haemophilus species:

H. influenzae

H. parainfluenzae

H. haemolyticus

H. parahaemolyticus

Escherichia coli

Salmonella species

Shigella species

Proteus species

Enterobacter species

Pseudomonas species

Results of Test: **PASSED**

6/24/15

LOT RPD250D

Anexo IV

<http://jvi.asm.org/>



Journal of
Virology

Manuscript Submission
and Peer Review System

[home](#) | [help for authors](#) | [help for reviewers](#) | [contact JVI™ staff](#) | [JVI™ home](#) | [logout](#)

Manuscript #	JVI00177-16
Current Revision #	0
Submission Date	2016-01-28 05:41:56
Current Stage	Under Review
Title	Viral megalomania: the large marseillevirus explores different entry pathways by forming giant infectious vesicles
Running Title	Marseillevirus explores different entry pathways
Manuscript Type	Full-Length Text
Journal Section	Virus-Cell Interactions
Corresponding Author	Dr. Jonatas Santos Abrahao (UFMG)
Contributing Authors	Mrs. Thalita Souza Arantes , Dr. Rodrigo Araújo Lima Rodrigues , Dr. Ludmila Karen Santos Silva , Dr. Grazielle Oliveira , Mr. Helton de Souza , Jacques Yaacoub Bou Khalil , danilo oliveira , Miss ALICE A TORRES , Dr. Luis da Silva , Prof. Philippe Colson , Dr. Erna Geessien Kroon , Dr. Flavio Guimaraes Da Fonseca , Prof. Claudio A BONJARDIM , Prof. Bernard La Scola
Abstract	Triggering the amoebal phagocytosis process is a sine qua non condition required by most of the giant viruses to initiate their replication cycle. This process requires the recognition of particles >500 nm, and many giant viruses meet this requirement. However, the Marseillevirus marseillevirus (MsV) is unusual as, despite being ~250 nm it is able to replicate in Acanthamoeba. To better understand this, we thoroughly investigated the MsV replication cycle. Our results revealed that the MsV is able to form giant vesicles, containing dozens to thousands of viral particles, wrapped in membranes derived from amoebal endoplasmic reticulum. Remarkably, our results strongly suggest that these giant vesicles are able to stimulate phagocytosis using an acidification-independent process. Our work not only describes the main features of the MsV replication cycle, but also, to our knowledge, this study is the first to describe the formation of huge infective vesicles in a large DNA virus.
Importance	Triggering the amoebal phagocytosis process is a sine qua non condition required by most of the giant viruses to initiate their replication cycle. This process requires the recognition of particles >500 nm, and many giant viruses meet this requirement. However, the Marseillevirus marseillevirus (MsV) is unusual as, despite being ~250 nm it is able to replicate in Acanthamoeba. Our results revealed that the MsV is able to form giant vesicles, containing dozens to thousands of viral particles, wrapped in membranes derived from amoebal endoplasmic reticulum. Remarkably, our results strongly suggest that these giant vesicles are able to stimulate phagocytosis using an acidification-independent process. Our work not only describes the main features of the MsV replication cycle, but also, to our knowledge, this study is the first to describe the formation of huge infective vesicles in a large DNA virus.
Editor	Grant McFadden
Suggested Reviewers to Include	Didier Raoult (Aix Marseille Université), Filippo Turrini (University of Milan), Gilbert Greub (Institut de Microbiologie de l'Université de Lausanne), Max Nilbert (Harvard University), Ana Franco (UFRGS)
Suggested Reviewers to Exclude	Chantal Abergel (Aix Marseille Université), Jean-Michel Claverie (Aix Marseille Université)
Keywords	Marseillevirus marseillevirus, giant vesicles, phagocytosis, viral entry
Research Areas	Host-Microbial Interactions, Virology
Conflict of Interest	No conflict of interest.
Funding Sources	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) ✓ : Jonatas Santos Abrahao 470645/2011-3

Manuscript Items

1. Author Cover Letter (last updated: 01/27/2016 13:28:13) [PDF \(94KB\)](#)
2. Merged File containing manuscript text and 6 Figure files. (last updated: 01/28/2016 05:37:37) [PDF \(10725KB\)](#)
- a. Manuscript Text File (last updated: 01/28/2016 05:37:37) [PDF \(204KB\)](#)
- b. Figure 1 (last updated: 01/27/2016 13:28:40) [PDF \(2632KB\)](#)
Figure
- c. Figure 2 (last updated: 01/27/2016 13:28:40) [PDF \(1846KB\)](#)
Figure
- d. Figure 3 (last updated: 01/27/2016 13:28:40) [PDF \(1909KB\)](#)
Figure
- e. Figure 4 (last updated: 01/27/2016 13:28:40) [PDF \(1880KB\)](#)
Figure
- f. Figure 5 (last updated: 01/27/2016 13:28:40) [PDF \(841KB\)](#)
Figure
- g. Figure 6 (last updated: 01/27/2016 13:28:40) [PDF \(1409KB\)](#)
Figure

More Manuscript Info and Tools

[Send Manuscript Correspondence](#)
[Check Status](#)

[home](#) | [help for authors](#) | [help for reviewers](#) | [contact JVI™ staff](#) | [JVI™ home](#) | [logout](#)

TERMS OF SERVICE
Licensed under Patent #US 7,620,555B1

eJournalPress