

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
DAVID VALTER PEREIRA**

**EFEITOS DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO SOBRE A
UVEÍTE INDUZIDA POR ENDOTOXINA EM RATOS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Felipe Dal-Pizzol

CRICIÚMA, DEZEMBRO DE 2012

FOLHA INFORMATIVA

A Presente defesa de Tese foi elaborada segundo Vancouver e será apresentada no formato tradicional.

Este Trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Fisiopatologia Experimental do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense.



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC

Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão

Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)

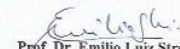
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de 03.06.2005

PARECER

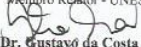
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Tese de DOUTORADO apresentada pelo candidato David Valter Pereira sob o título “Efeitos das nanopartículas de ouro sobre a uveíte induzida por endotoxina em ratos” para obtenção do grau de DOUTOR EM CIÊNCIAS DA SAÚDE do Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

Após haver analisado o referido trabalho e arguido o candidato, os membros são de parecer pela “APROVAÇÃO” da Tese, com conceito A.

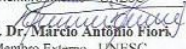
Criciúma, SC, 20 de dezembro de 2012.


Prof. Dr. Emilio Luiz Streck

Membro Relator - UNESC


Prof. Dr. Gustavo da Costa Ferreira

Membro Interno - UNESC


Prof. Dr. Márcio Antônio Fiori

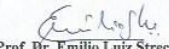
Membro Externo - UNESC


Profa. Dra. Clarissa Comim

Membro Externo - UNISUL


Prof. Dr. Eclipe Dal Pizzol

Orientador


Prof. Dr. Emilio Luiz Streck

Coordenador do PPGCS

RESUMO

A uveíte induzida pela administração de endotoxina (EIU) é caracterizada por infiltração de leucócitos, quebra da barreira hemato-ocular e morte das células da retina. Neste contexto, o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) está implicado na fisiopatologia da doença e contribui diretamente para a hipermeabilidade vascular na retina. As nanopartículas de ouro (GNP) exercem atividades anti-angiogênicas e reduzem a infiltração de macrófagos subsequentemente reduzindo a inflamação em modelos animais de artrite e retinopatia da prematuridade. O mecanismo exato de ação anti-inflamatório das GNP na uveíte ainda não é conhecido, mas acreditamos que a via de sinalização TLR4-NFκB esteja envolvida no processo já que recentes pesquisas sugerem que a via de sinalização TLR4 pode estar envolvida na patogênese da uveíte. Por isso este estudo avalia os efeitos das nanopartículas de ouro em EIU em ratos. Ratos adultos machos Wistar foram divididos em cinco grupos: salina + salina, LPS + salina, LPS + prednisolona, LPS + sal de ouro (GS) e LPS + nanopartícula de ouro (GNP). Duas horas após a administração do LPS, o acetato de prednisolona a 1%, GS e GNP foram aplicados topicamente em ambos os olhos dos ratos e repetido a cada 6 horas durante 24 horas. Após 24 horas os ratos foram anestesiados e amostras do humor aquoso foram aspiradas bilateralmente com uma agulha 30-G e as íris e a retina foram removidas sob a visualização de um microscópio. A atividade da mieloperoxidase no humor aquoso foi medida como um índice de infiltração de neutrófilos. Os danos oxidativos foram determinados pela medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e proteína carbonil. Os níveis de VEGF e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) foram medidos utilizando o ensaio ELISA. Os níveis de receptor 2 de VEGF (VEGFR2), TLR4 e NF- κ B foram determinados por Western blotting. A administração de LPS induziu uma resposta inflamatória no olho caracterizada por um aumento de TNF- α e mieloperoxidase no humor aquoso, de VEGF na retina e pelo dano oxidativo na íris. Todos estes parâmetros foram reduzidos pela administração da GNP, exceto os níveis de VEGF na retina. Uma vez que a resposta inflamatória secundária a administração do LPS depende, em parte, da ativação da via TLR4-NFκB e do VEGF, nós demonstramos aqui que o potencial mecanismo para explicar os efeitos da GNP foi diminuir a ativação nos níveis de TLR4 e NFκB. Estes achados sugerem que a GNP tópica diminuem a inflamação intraocular

e os danos oxidativos por interferir nas vias TLR4-NFκB, mas não por inibir a sinalização de VEGF.

Palavras-chave: uveíte; lipopolissacarídeo; prednisolona; nanopartículas de ouro; sal de ouro; VEGF.

ABSTRACT

Endotoxin-induced uveitis (EIU) is characterized by leukocyte infiltration, breakdown of the blood-ocular barrier, and retinal cell death. In this context, vascular endothelial growth factor (VEGF) has been implicated in the pathophysiology of the disease and directly contributes to the retinal vascular hyperpermeability. Gold nanoparticles (GNP) exerted antiangiogenic activities and subsequently reduced macrophage infiltration and inflammation in animal models of arthritis and retinopathy of prematurity. The precise modes of action anti-inflammatory of the GNP in uveitis have not been clarified, but we believe that the TLR4-NF κ B signaling pathway is involved in the process since recent research suggests that TLR4 signaling pathways might be involved in the pathogenesis of uveitis. Therefore, this study evaluates the effects of gold nanoparticles in EIU in rats. Adult male Wistar rats were divided into five groups: saline + saline, LPS + saline, LPS + prednisolone, LPS + gold salt (GS) and LPS + gold nanoparticle (GNP). Two hours after LPS administration, prednisolone acetate 1%, GS and GNP were topically applied to both eyes of rats and repeated every 6 hours for 24 hours. After 24 hours rats were anesthetized and aqueous humor was sampled aspirated bilaterally with a 30-G needle and the irides and retina were removed under a microscope viewing. As an index of neutrophil infiltration it was measured myeloperoxidase activity in the aqueous humor. Irides oxidative damage was determined by the measure of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and protein carbonyl content. The levels of VEGF and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) were measured using the ELISA assay. Levels of VEGF receptor 2 (VEGFR2), TLR4 and NF- κ B were determined by Western blotting. The administration of LPS induced eye inflammatory response characterized by an increase in aqueous humor TNF- α and myeloperoxidase, by increase retinal levels of VEGF and by irides oxidative damage. All these parameters were decreased by the administration of GNP, except levels VEGF in the retina. Since the inflammatory response secondary to LPS administration depends, in part, to the activation of the TLR4-NF- κ B and VEGF pathways we demonstrated here that a potential mechanism to explain the GNP effects was the decrease on TLR4 content and NF- κ B activation. These findings suggest that topical GNP decreases intraocular inflammation and oxidative damage by interfering in the TLR4-NF- κ B pathways, but not by inhibiting VEGF signaling.

Keywords: uveitis; lipopolysaccharide; prednisolone; gold nanoparticles; gold salt; VEGF.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA- análise de variância por uma via
AP-1- proteína ativadora-1
Au (0)- ouro metálico
BAFFR- fator ativador de células B
BCR- receptor de células B
CD40- grupo de diferenciação 40
EAU- uveíte auto-imune experimental
EIU- uveíte induzida pela administração de endotoxina
ELISA- do inglês “enzyme-linked immunosorbent assay”
EO- epinefrina oxidase
ERO- espécies reativas de oxigênio
GNP- nanopartículas de ouro
GS- sal de ouro
IKK- enzima quinase I κ B
IL-1- interleucina-1
LPS- Lipopolissacarídeo
LT β R- receptor de linfotoxina β
MDA- malondialdeído
MPO- mieloperoxidase
NADPH- nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NF- κ B- fator nuclear- κ B
PAMPs- do inglês “pathogen-associated molecular patterns”
PRRs- receptores de reconhecimento da imunidade inata
SPR- ressonância de plasmons de Superfície
TBARS- substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCR- receptor de células T
TLR- receptor similar a Toll
TNF- α - fator de necrose tumoral alfa
TNFR1- receptor 1 do fator de necrose tumoral
UV-vis- ultravioleta visível
VEGF- fator de crescimento endotelial vascular
XRD- difração de raios-X

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 UVEÍTES – PRINCÍPIOS GERAIS	19
1.2 FISIOPATOLOGIA DA UVEÍTE	20
1.3 USO TERAPÊUTICO DO OURO.....	24
1.4 NANOTECNOLOGIA – APLICAÇÕES GERAIS	26
2. OBJETIVOS	28
2.1 OBJETIVO GERAL:.....	28
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	28
3 MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO	29
3.2 ANIMAIS	29
3.3 UVEÍTE INDUZIDA PELA ADMINISTRAÇÃO DE ENDOTOXINA E TRATAMENTOS.....	30
3.4 RESPOSTA INFLAMATÓRIA NO HUMOR AQUOSO	30
3.5 DANO OXIDATIVO NA ÍRIS.....	31
3.6 ANÁLISE POR WESTERN BLOTTING DOS RECEPTORES DO TIPO TOLL-LIKE 4 (TLR4) E FATOR NUCLEAR-KB (NFkB) NA ÍRIS E RECEPTOR 2 DE VEGF NA RETINA	31
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
4. RESULTADOS	33
4.1 CARACTERIZAÇÃO DA GNP	33
4.2 EFEITOS DAS GNP NOS MARCADORES INFLAMATÓRIOS EM EIU	35
4.3 EFEITOS DAS GNP EM DANO OXIDATIVO INDUZIDOS NA ÍRIS POR EIU	37
4.4 EFEITOS DAS GNP NOS NÍVEIS DE TLR4 E ATIVAÇÃO DE NF-κB.....	39
4.5 EFEITOS DAS GNP NOS NÍVEIS DE VEGF NA RETINA	40
5. DISCUSSÃO	42
6. CONCLUSÃO	50
REFERÊNCIAS	51

1 INTRODUÇÃO

1.1 UVEÍTES – PRINCÍPIOS GERAIS

As primeiras descrições de inflamação ocular datam de 1500 aC (Ebers's papyrus) (Meira et al., 2005; Gasparin et al., 2012). O termo uveíte foi usado pela primeira vez para caracterizar qualquer tipo de inflamação intraocular com etiologia não infecciosa (Meira et al., 2005; Gasparin et al., 2012). Nos dias de hoje diz-se que uveíte é um distúrbio ocular caracterizado por inflamação intra-ocular que acomete o trato uveal (íris, corpo ciliar e coroide) (Gardiner et al., 2002; Oréfice, 2005; Melamed et al., 2010) e estruturas vizinhas (Kahn e Moorhead, 1973) e pode ser classificada de acordo com o sítio de envolvimento como anterior (íris), intermediária (corpo ciliar e vítreo) e posterior (vítreo, retina, coroide, vasos da retina e coroide, esclera e também do nervo óptico). Uveítes com acometimento de mais de uma porção uveal são chamadas de difusas, apresentando geralmente acometimento bilateral (Chams et al., 2009; Melamed et al., 2010).

A uveíte é encontrada em todo o mundo com etiologias diferentes, incluindo infecções, doenças sistêmicas, trauma, doenças imunológicas, drogas e câncer (Chams et al., 2009). Geralmente afeta pessoas entre 20-50 anos de idade (Vaughan et al., 2003). A incidência anual de uveíte varia, de acordo com o país, entre 17-52 casos por 100.000 habitantes, com uma prevalência de 38-714 casos por 100.000 habitantes (Wakefield e Chang, 2005; Kim e Foster, 2006). As uveítes são responsáveis por cerca de 10 % dos casos de deficiência visual no mundo ocidental e aproximadamente 35 % dos pacientes referem cegueira ou baixa visão (Wakefield e Chang, 2005; Kim e Foster, 2006).

As uveítes podem ser divididas em infecciosas, nas quais o patógeno responsável é identificado e o paciente é submetido a tratamento antimicrobiano específico, e não infecciosas (Melamed et al., 2010). Em nosso meio, uveíte é o principal diagnóstico encontrado em indivíduos que frequentam instituições para reabilitação visual (Kara-José et al., 1988) e é responsável por 4% dos atendimentos em serviço de urgência (Nascimento et al., 1999). Em uma revisão da literatura sobre epidemiologia e prevalência das uveítes feita por Chams et al. (2009) relacionando diversos estudos da Ásia, África, França, leste e oeste dos Estados Unidos e Argentina, verificou-se que a incidência, com raras exceções, é igual entre homens e mulheres, e não se encontrou a causa em 14 a 51,2%, sendo que a etiologia e o tipo de

uveíte depende da localização de cada País e do seu grau de desenvolvimento.

Na maioria dos artigos a uveíte não infecciosa dominou as infecciosas (45% a 94,8%) e das infecciosas a leptospirose e tuberculose se apresentam com mais frequência nos países em desenvolvimento, com exceção do herpes simples que domina o mundo ocidental. A toxoplasmose permanece a etiologia predominante na uveíte posterior na maioria dos artigos, excluindo a retinopatia por citomegalovírus que domina todas as causas de uveíte posterior nos últimos 30 anos devido a extensão global da síndrome da imunodeficiência adquirida (Chams et al., 2009).

Nos Estados Unidos, há maior frequência de uveíte anterior (51,6%), seguido da uveíte posterior (19,4%), panuveíte (16%), intermediária (13%) (Rodriguez et al., 1996). Na Europa, a uveíte anterior é mais frequente (Tran et al., 1994; Pivetti et al., 1996; Päivönsalo et al., 1997). No Brasil, vários autores mostraram maior frequência na faixa etária de 0 a 40 anos (Abreu et al., 1980; Fernandes e Oréfice, 1996). A uveíte posterior mostrou-se frequente em todas as faixas etárias, com um pico entre 20 e 40 anos, possivelmente associado à alta incidência de toxoplasmose na população brasileira (Fernandes et al., 2005). Estudos epidemiológicos realizados por Melamed et al. (1997), em 654 pacientes atendidos na clínica de uveítes da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, e por Fernandes e Oréfice (1996), em 3.317 pacientes atendidos no Hospital São Geraldo-Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, serviço público, e em clínica privada em Belo Horizonte, demonstraram que a toxoplasmose, importante causa de uveítes no Brasil, mostrou-se como a uveíte mais frequente, respondendo por até 73,1% dos casos.

1.2 FISIOPATOLOGIA DA UVEÍTE

Embora o mecanismo patogênico exato de várias uveítes seja desconhecido, observa-se o envolvimento de diferentes citocinas no processo (Takase et al., 2006). Assim, polimorfismos que resultem em aumento da produção de citocinas inflamatórias ou diminuição da produção de citocinas anti-inflamatórias na ocorrência de uveíte podem predispor a uma maior inflamação intra-ocular (Nussbaum et al., 2001). A uveíte pode ser desenvolvida a partir de diversas etiologias (Dick, 2000). No nosso estudo usamos a endotoxina que é um lipopolissacarídeo (LPS) situado na parede das bactérias Gram-negativas (figura 1) (Giroir, 1993).

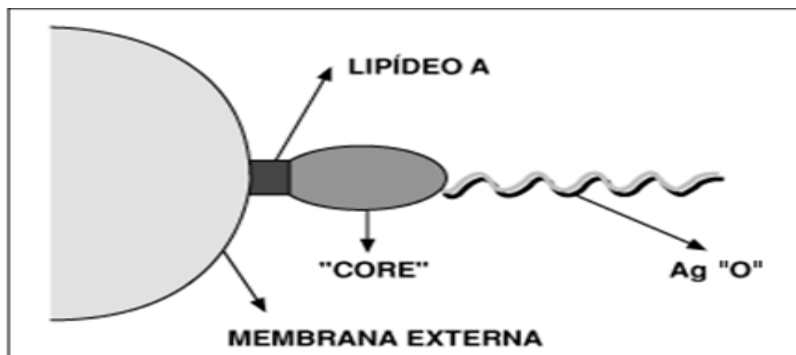


Figura 1. Estrutura da endotoxina bacteriana
 Fonte: (Giroir, 1993).

Sua molécula é composta por uma cadeia lateral de polissacarídeo (Antígeno O), e ligada à região do “core”, um oligossacarídeo (2-ceto-3-ácido deoxioctônico); este por sua vez está ligado a uma molécula lipídica (Lipídeo A). O antígeno O varia entre as espécies de bactérias Gram-negativas tanto em composição como em comprimento, enquanto a região do core e do lipídeo A são mais conservados entre as diferentes espécies de bactérias Gram-negativas. O lipídeo A é o principal componente ativo e tóxico da endotoxina (Giroir, 1993; Zivot e Hoffman, 1995).

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) é o mediador inflamatório em modelos animais de uveíte (Mo, 1998; Koizumi et al., 2003). Essa citocina é encontrada em altos níveis no soro e no humor aquoso de pacientes com uveíte (Pérez-Guijo et al., 2004). As citocinas são proteínas formadas no interior das células e, quando liberadas, interagem com receptores celulares (transmembrânicos) produzindo seu efeito biológico (Hamblin, 1993). Dependendo do local onde agem, podem exercer uma ação autócrina (quando agem na própria célula que a produziu), parácrina (agem em células vizinhas) ou endócrina (agem à distância). Cada citocina possui múltiplas ações (efeito pleiotrópico) podendo agir em sinergismo ou antagonismo, como ocorre no sinergismo entre TNF- α e a interleucina (IL-1) (Ribeiro e Pereira, 2003), que são as principais citocinas liberadas no processo inflamatório (Hamblin, 1993; Abbas et al., 1998). O TNF- α é produzido por macrófagos ativados ou, ainda, por linfócitos e monócitos. Após ligar-se a seus receptores o TNF- α vai estimular a transcrição e a produção da enzima I κ B quinase, a qual irá ativar o fator nuclear κ B (NF- κ B). O NF-

κ b, quando ativado, irá agir no núcleo da célula, induzindo a produção de diversas proteínas envolvidas nas respostas inflamatória e imunológica responsáveis pelas principais ações biológicas do TNF- α (Bingham, 2002).

Descoberto em 1986, o NF- κ B é um fator nuclear (NF) que, uma vez ativado por agentes como lipopolissacarídeos, possui a capacidade de ligar-se a uma sequência de 10 pares de bases na região promotora do gene que codifica a cadeia leve κ das moléculas de anticorpo das células B (κ B) (Sem e Baltimore, 1986). O NF- κ B se ativa por vários estímulos como lipopolissacarídeos bacterianos, vírus, estresse oxidativo, luz ultravioleta, radiação ionizante e drogas genotóxicas. Sua ativação se produz pelas vias de sinalização do receptor 1 do fator de necrose tumoral (TNFR1), o receptor 1 de interleucina 1 (IL-1R1), o receptor similar a Toll (TLR), o receptor de células B (BCR), o receptor de células T (TCR), receptor de linfotóxina β (LT β R), o fator ativador de células B (BAFFR) e o grupo de diferenciação 40 (CD40) (Gloire et al., 2006). O NF- κ B se encontra no citoplasma na forma inativa unido a proteínas inibidoras, os quais depois de um estímulo adequado são fosforiladas, ubiquitinizadas e degradadas pelo proteossoma, permitindo assim a liberação do NF- κ B que se transloca ao núcleo onde regula a transcrição de genes (Beinke e Ley, 2004). O mecanismo de ação do NF- κ B é sintetizado na figura 2 (Brasier, 2006; Gilmore, 2006; Perkins, 2007).

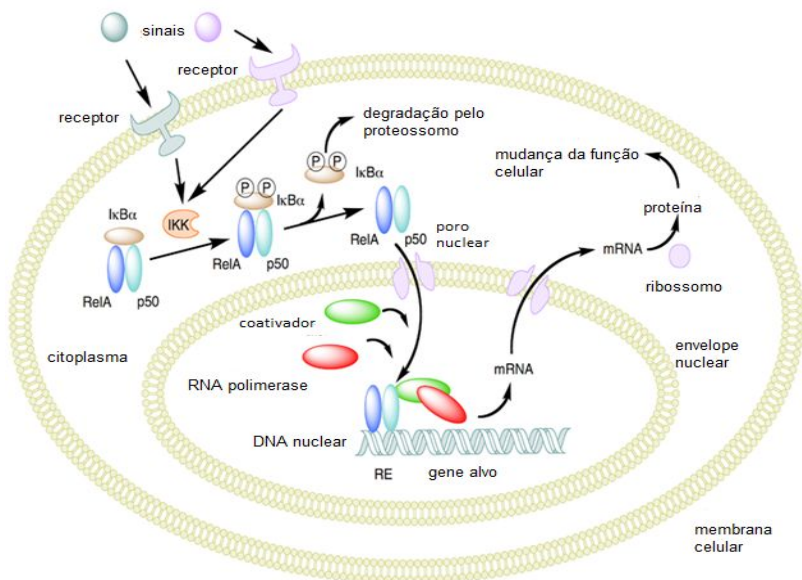


Figura 2. Mecanismo de ação do NF-κB. Nesta figura, são usados como um exemplo o heterodímero do NF-κB as proteínas p50 e Rel. No estado inativado, o NF-κB está localizado no citosol formando um complexo com a proteína inibitória IκBα. Por intermédio de receptores íntegros de membrana, uma variedade de sinais extracelulares podem ativar a enzima quinase IκB (IKK). IKK, por sua vez, fosforila a proteína IκBα, o que resulta na ubiquitinação, dissociação de IκBα de NF-κB, e degradação da eventual IκBα pelo proteossomo. O NF-κB ativado é então translocado para o núcleo onde se liga a seqüências específicas de DNA chamados elementos de resposta (RE). O complexo DNA / NF-κB então recruta outras proteínas, como coativadores e RNA polimerase, que transcreve a jusante DNA em mRNA, que, por sua vez, é traduzido em proteína, o que resulta em uma mudança da função das células. (adaptado Brasier, 2006; Gilmore, 2006; Perkins, 2007).

Pesquisas em modelos experimentais têm sido importantes para explicar os mecanismos fisiopatológicos envolvidos nas diferentes doenças inflamatórias oculares auto-imunes. A uveíte auto-imune experimental (EAU) é um dos modelos animais mais utilizados. Após a imunização com antígenos uveitogênicos, os animais desenvolvem uma resposta imunitária mediada principalmente por células T CD4. Os achados clínicos são semelhantes a algumas uveítes auto-imune em

humanos. Mesmo que estes modelos contribuem para um melhor entendimento da fisiopatologia da uveíte auto-imune em humanos, ainda há muitas perguntas a serem respondidas, como gatilhos, recidivas, e susceptibilidade individual.

Achados clínicos heterogêneos podem estar relacionados com a observação de que cada indivíduo pode responder a mais do que um epítipo de antígeno e por responder de forma diferente a cada um deles, dependendo da forma como é apresentado e como é reconhecido pelo sistema imunitário. Ultimamente, novos modelos experimentais de inflamação ocular estão disponíveis devido aos avanços da genética e da engenharia molecular. Estes modelos podem ajudar o desenvolvimento de novas terapias, com medicamentos mais específicos e eficiente, evitando efeitos colaterais. Além disso, os modelos animais são importantes para o estudo de novas vias de administração de medicamentos, em especial por injeção intravítrea (Gasparin et al., 2012).

1.3 USO TERAPÊUTICO DO OURO

O ouro tem uma longa história de uso (Higby, 1982). Preparações de ouro são usadas para o benefício terapêutico pelas culturas árabe, chinesa e indiana desde 2500 A.C. (Kean et al., 1985; Zhao e Ning, 2001). O ouro coloidal vermelho ainda está em uso hoje na Índia sob a forma de medicina *ayurveda* para o rejuvenescimento e revitalização durante a velhice sob o nome de Swarna Bhasma (“Swarna” significando ouro, “Bhasma” significando cinzas) (Mahdihassan, 1971; Mahdihassan, 1981). Na Índia cinábrio-ouro é conhecido como “Makaradhwaaja” (Mahdihassan, 1985). É usado como um medicamento para se obter o vigor da juventude (Fricker e Buckley, 1996). Dentro do contexto da tradicional medicina *ayurvédica* indiana, Swarna bhasma são utilizadas como agente terapêutico para várias doenças clínicas, incluindo asma brônquica, artrite reumatóide e diabetes mellitus. (Bajaj e Vohora, 2000; Shah et al., 2005). O ouro também tem uma longa história de uso no mundo ocidental como calmante, uma substância que poderia revitalizar as pessoas que sofrem de doenças nervosas (Fricker e Buckley, 1996).

No século 16 o ouro foi recomendado para o tratamento da epilepsia (Daniel e Astruc, 2004). No início do século 19 o ouro foi a droga de escolha para o tratamento da sífilis (Daniel e Astruc, 2004).

A descoberta por Robert Koch do efeito bacteriostático do cianeto de ouro no bacilo da tuberculose marca o início do uso do ouro na medicina moderna. Então a terapia baseada em ouro para a

tuberculose foi introduzida em 1920 (Daniel e Astruc, 2004). As principais utilizações clínicas de compostos de ouro são no tratamento de doenças reumáticas, incluindo psoríase, artrite juvenil, reumatismo palindrômico e lúpus eritematoso discóide (Felson, 1990; Shaw, 1999).

Cabe aqui destacar que não há na literatura qualquer estudo do uso de ouro, muito menos das nanopartículas de ouro para o tratamento da uveíte. Sabe-se que a estrutura colagenosa da esclera e o envoltório pela episclera são comparados à constituição sinovial, sugerindo analogia do olho com articulação esferoidal.

Ressalte-se que doenças que acometem estruturas articulares geralmente atingem a bainha escleral-episcleral (Foster et al., 1999), e que há diversos estudos no emprego de sais de ouro e das nanopartículas de ouro no tratamento da artrite reumatoide (Pincus et al., 2002; Brown et al., 2006; Tsai et al., 2008). Procurou-se observar os efeitos que essas drogas possuem sobre os processos inflamatórios articulares e comparar com os dados obtidos neste estudo.

Compostos de ouro (por exemplo, Auranofin e Myocrisin) têm sido utilizados como tratamento anti-inflamatório contra a artrite reumatoide, durante mais de 50 anos (Yoshida et al., 1999; Eisler, 2003; Zhang e Lippard, 2003). *In vivo* os efeitos anti-inflamatórios dos íons de ouro envolvem supressão da ativação de macrófagos e micróglia no cérebro danificado (Larsen et al., 2008). Como mostrado *in vitro*, os mecanismos moleculares de ações do ouro também implicam em diminuição dos níveis de mediadores pró-inflamatórios como interleucinas, TNF- α e eicosanóides, bem como a inativação de enzimas fagolisossomais, I κ B-quinase e atividade do NF- κ B (Kuhn et al., 1985; Yang et al., 1995; Burmester, 2001; Yamashita et al., 2003; Chircorian e Barrios, 2004; Wataha et al., 2004; Navarro et al., 2006; Han et al., 2008).

Os sais de ouro inibem a produção do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) nas células sinoviais em cultura estimuladas com LPS (Nagashima ET al., 2000). O modo preciso de ação dos compostos de ouro na artrite reumatoide não está bem claro, mas uma interação com grupos tióis nas proteínas e membranas celulares parecem ser importantes (Tsai et al., 2007).

Sais de ouro, tais como o aurotiomalato de sódio, são muito utilizados no tratamento de pacientes com artrite reumatoide. No entanto, seus efeitos colaterais resultam em descontinuidade do tratamento em 30-45% dos pacientes (Nagashima et al., 2000). Há duas drogas de ouro mais comumente usadas: o Auranofin® e Myocrisin®, que têm como efeitos colaterais adversos a dermatite, náusea, danos na

medula óssea, etc (Brown et al., 2006). Alguns dos efeitos colaterais no uso do ouro em medicina, *crisoterapia*, podem estar relacionados à geração do ouro (III). O ouro monovalente (I) como o Auranofin® e Myocrisin® catalizam a ions de ouro (III) e ouro metálico Au(0). O ouro (III), como outros metais pesados, desnaturam proteínas e ácidos nucleicos, e podem ser responsáveis por grande parte da toxicidade das drogas com ouro (I) administradas (Shaw III, 1999; De Wall et al., 2006). Em longo prazo o acúmulo de sais de ouro no organismo podem resultar em efeitos adversos ou tóxicos (Merchant, 1988). Por outro lado, o ouro metálico tem sido considerado biologicamente inerte, ainda que possa se acumular nos lisossomos após a injeção do ouro(I) (Brown et al., 2006).

1.4 NANOTECNOLOGIA – APLICAÇÕES GERAIS

Os termos nanociências e nanotecnologias se referem, respectivamente, ao estudo e às aplicações tecnológicas de objetos e dispositivos que tenham ao menos uma de suas dimensões físicas menores que, ou da ordem de, algumas dezenas de nanômetros. *Nano* (do grego: "anão") é um prefixo usado nas ciências para designar uma parte em um bilhão e, assim, um nanômetro (1nm) corresponde a um bilionésimo de um metro (Lêdo et al., 2007).

O objetivo da nanotecnologia é o de criar novos materiais, desenvolver novos produtos e processos fundamentados na crescente capacidade da tecnologia moderna de ver e manipular átomos e moléculas (Silva, 2002).

Ao longo das últimas décadas, as nanopartículas inorgânicas, cujas estruturas apresentam distintas propriedades físicas, químicas, biológicas e funcionais devido ao seu tamanho em nanoescala, têm despertado muito interesse. Materiais em nanoestrutura estão atraindo grande atenção devido ao seu potencial para a realização de processos específicos e seletividade, especialmente em aplicações biológicas e farmacêuticas (Mirkin e Taton, 2000; Alivisatos, 2004; Daniel e Astruc, 2004; Love, 2005; Nie et al., 2007; Wang et al., 2007).

Descobertas na última década mostram que as propriedades eletromagnéticas, ópticas, e catalíticas das nanopartículas de ouro são fortemente influenciados pela forma e tamanho (Mulvaney, 1996; Burda et al., 2005). Isto motivou um aumento nas pesquisas sobre as vias de síntese que permitem um melhor controle sobre a forma e tamanho em várias aplicações nanotecnológicas.

Em medicina, a nanotecnologia é utilizada para detecção precoce, diagnóstico e tratamento de doenças (Hirsch et al., 2003a; Hirsch et al., 2003b; Bhattacharya et al., 2007; You et al., 2007; Han et al., 2007).

O nano ouro (também chamado nanopartículas de ouro ou ouro coloidal) tem sido ativamente investigados em uma ampla variedade de aplicações biomédicas, devido à sua biocompatibilidade e facilidade de conjugação a biomoléculas (Alivisatos et al., 1996; Mirkin et al., 1996; Sokolov et al., 2003; Levy et al., 2004; Tsai et al., 2004).

Os estudos das nanopartículas de ouro na interação com fagócitos *in vitro* demonstram suas propriedades biocompatíveis, tais como a sua baixa toxicidade, baixa imunogenicidade e alta permeabilidade nos tecidos, sem dificultar a funcionabilidade da célula (Shukla et al., 2005).

Ao contrário dos glicocorticoides que são a primeira escolha no tratamento das uveítes (Crispin, 1988; Jabs et al., 2000) bem como os sais de ouro que são um dos tratamentos da artrite reumatoide (Bajaj e Vohora, 2000; Shah e Vohora, 2002; Shah et al., 2005) as nanopartículas de ouro até o momento não revelam efeitos colaterais e além disso são eficazes anti-inflamatórios como exibem os pesquisadores de Taiwan que testaram a eficácia das nanopartículas de ouro para melhorar a artrite induzida por colágeno (CIA) em ratos (Tsai et al., 2007).

Neste estudos eles mostram que as nanopartículas de ouro exercem um poder anti-inflamatório pelo fato delas inibirem a angiogênese e subsequentemente os níveis de TNF- α e interleucina-1 (IL-1). E também no artigo de Brown et al. (2006), onde foi evidenciado que o ouro metálico coloidal (tamanho médio da partícula de 27 nm) é um agente anti-artrítico no rato mais potente e eficaz do que o aurotiomalato de sódio que é utilizado para o tratamento da artrite reumatóide.

Tendo em conta estas propriedades anti-inflamatórias e baixa toxicidade das nanopartículas de ouro (Shukla et al., 2005), o presente estudo investiga as aplicações potenciais das nanopartículas de ouro no desenvolvimento da resposta inflamatória em um modelo animal de uveíte.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL:

Avaliar os efeitos do tratamento com a solução de nanopartículas de ouro em modelo animal de uveíte induzida por injeção de LPS.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Caracterizar as nanopartículas de ouro utilizadas nos experimentos *in vivo*.
- Determinar os efeitos das nanopartículas de ouro sobre parâmetros de dano oxidativo na íris em modelo animal de uveíte.
- Determinar os efeitos das nanopartículas de ouro sobre parâmetros de inflamação no humor aquoso em modelo animal de uveíte.
- Determinar os efeitos das nanopartículas de ouro sobre a via TLR4-NF- κ B em humor aquoso em modelo animal de uveíte.
- Determinar os efeitos das nanopartículas de ouro sobre a via VEGFR2/VEGF em modelo animal de uveíte.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO

As nanopartículas de ouro (GNP) foram preparadas como descrito por Turkevich et al. (1951). Em resumo, os frascos de vidro foram lavados em água régia e enxaguados em água ultrapura. Em seguida uma solução de ácido auroclorídrico (0,2 mM) foi suavemente aquecida até 90 °C e citrato de sódio (39 mM) foram adicionados. Após 20 minutos de vigorosa agitação e submetida a refluxo, a solução foi esfriada até à temperatura ambiente (20 ± 2 °C) e as GNP foram purificadas por uma série de centrifugações a 9.000 g por 10 minutos, seguidas pela remoção do sobrenadante e enxague com água ultrapura. O pó resultante foi ressuspenso em solução salina (NaCl 0,9 %) e armazenados a 7 °C até serem usados.

Com o objetivo de caracterizar as nanopartículas de ouro, as medidas de UV-visível foram realizadas utilizando um espectrofotômetro Shimadzu UV-1800. O espectrômetro de absorção atômica Varian AA240Z foi utilizado para avaliar a concentração de ouro. As GNP foram totalmente dissolvidas em água régia antes da análise. A morfologia e o diâmetro médio das partículas foram obtidos por análise de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) usando um JEOL Titan de 80-300 kV e difração de raios-X (XRD) utilizando um difratômetro Shimadzu XRD-6000 com fonte de raios-X de cobre com radiação de comprimento de onda 1.5406 Å, voltagem de 30 kV e corrente de 30 mA. O tamanho médio da partícula foi calculado também a partir de medidas pelo XRD aplicando a equação de Scherrer, $L = \kappa\lambda/\beta \cos(\theta)$, onde $\kappa = 0.94$, uma constante característica das nanopartículas quase esféricas, λ é o comprimento de onda da radiação usada, β é a largura total a meia altura do pico em radianos e θ é o ângulo de Bragg (Aromal e Green, 2012).

3.2 ANIMAIS

Ratos machos Wistar pesando entre 300 e 350 gramas obtidos pela Universidade do Extremo Sul Catarinense foram alojados individualmente em condições normais (com temperatura ambiente de 22-24°C em ciclos claro/escuro de 12h.).

Todos os estudos foram realizados de acordo com as orientações do Instituto Nacional de Saúde e os regulamentos da ARVO para o uso de animais pela *Association for Research in Vision and Ophthalmology*, com a aprovação da comissão de ética para o uso de animais da Universidade do Extremo Sul Catarinense (protocolo n° 61/2011). Os animais de experimento foram randomicamente divididos em cinco grupos (12 animais por grupo): salina + salina, LPS + salina, LPS + prednisolona, LPS + sal de ouro (GS) e LPS + GNP.

3.3 UVEÍTE INDUZIDA PELA ADMINISTRAÇÃO DE ENDOTOXINA E TRATAMENTOS

A uveíte induzida pela administração de endotoxina (EIU) foi induzida pela administração de LPS (*Escherichia coli*, serótipo 055: B5; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 100 µg/100 µL de cloreto de sódio 0,9% livre de pirógeno no tecido subcutâneo (Pereira et al., 2009). Duas horas após a administração de LPS; salina, acetato de prednisolona 1% (Latinofarma Industria Farmacêutica LTDA), GS (ácido auroclorídrico 2 mM) ou GNP (40mg/ml) foram aplicados topicamente em ambos os olhos dos ratos e repetido a cada 6 horas por 24 horas. Soluções isotônicas GS e GNP foram preparadas sob condições estéreis. Após 24 horas, os ratos foram anestesiados com cloridrato de quetamina (50mg/kg) e xilazina 2% (20 mg/kg), e amostras do humor aquoso foram aspiradas bilateralmente com agulha 30-gauge sob visualização de microscópio. As íris e as retinas foram excisadas e armazenadas a -80 °C para posterior análise.

3.4 RESPOSTA INFLAMATÓRIA NO HUMOR AQUOSO

O índice de infiltração de neutrófilos foi medido pela atividade da mieloperoxidase (MPO) como previamente descrito por De Young et al. (1989). Brevemente, o humor aquoso foi homogeneizado (50 mg/ml) em brometo de hexadeciltrimetilamônio e foi centrifugado a 15.000 g por 40 minutos. Uma alíquota do sobrenadante foi misturado com uma solução de 1.6 mM de tetrametilbenzidina e 1 mM de peróxido de hidrogênio. A Atividade foi medida espectrofotometricamente com a alteração da absorbância a 650 nm e 37 °C. Os níveis de VEGF e TNF-α no humor aquoso foram medidos pelo (do inglês “enzyme-linked immunosorbent assay”) (ELISA) de acordo com as instruções do fabricante (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

3.5 DANO OXIDATIVO NA ÍRIS

A formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) durante uma reação de aquecimento do ácido é amplamente adotada como um método sensível para medir o dano oxidativo (Draper e Hadley, 1990). Os homogeneizados de íris foram misturados com 1 mL de ácido tricloroacético 10 % e 1 mL de ácido tiobarbitúrico 0,76% e aquecida em um banho de água fervida durante 30 minutos. Foram determinados pela absorbância a 532 nm as TBARS. Os resultados foram expressos em equivalentes de malondialdeído (MDA) (nmol/mg de proteína). A oxidação das proteínas foi medida pela determinação do teor do grupo carbonil baseado na reação com a dinitrofenilhidrazina (DNPH), como previamente descrito por Levine et al. (1990). As proteínas foram precipitadas pela adição de ácido tricloroacético e redissolvidas em DNPH, e a absorbância foi monitorada a 370 nm.

3.6 ANÁLISE POR WESTERN BLOTTING DOS RECEPTORES DO TIPO TOLL-LIKE 4 (TLR4) E FATOR NUCLEAR-KB (NFKB) NA ÍRIS E RECEPTOR 2 DE VEGF NA RETINA

A determinação do TLR4 foi realizado em tecidos homogeneizados das íris e o NF-kB em extratos nucleares destes tecidos. VEGFR2 foi determinado em amostras de retina. As amostras foram centrifugadas a 11000 rpm e 4°C em um Beckman 70.1 Ti rotor (Palo Alto, CA) durante 40 minutos para remover o material insolúvel, e os sobrenadantes foram usados para quantificar as proteínas, utilizando o método segundo Bradford (1976).

Os extratos de proteínas obtidos foram desnaturados por aquecimento (Laemmli, 1970) em tampão da amostra contendo 100 mM DTT, executados na presença de SDS-PAGE e transferidas para membranas de nitrocelulose. As membranas foram bloqueadas, provadas e desenvolvidas com anticorpos anti-TLR4 e anti-NF-kB (Santa Cruz Biotechnology, Inc, CA) como descrito anteriormente (De Souza et al., 2003). Borrões foram expostos ao filme Kodak XAR com Cronex Lightning Plus, telas de intensificação a -80 ° C por 12-48 h. Intensidades de bandas foram quantificadas por densitometria óptica (software Scion Image, ScionCorp, Frederick, MD), desenvolvida autoradiografia.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados são expressos como média desvio padrão (\pm SD). Diferenças entre os grupos foram determinadas por análise de variância por uma via (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. A correlação entre VEGF, VEGFR2 e atividade da MPO foi realizada pelo teste de Pearson. Os valores $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos. Todas as análises estatísticas foram realizadas usando um pacote estatístico (SPSS 20.0 for Windows; SPSS, Inc., Chicago, IL).

4. RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA GNP

O espectro UV-Vis da solução de GNP mostra uma banda com absorção máxima a 520 nm devido a ressonância de plasmons de Superfície (SPR) que pode ser atribuído à oscilação coletiva dos elétrons de condução livre por interação eletromagnética (Toderas et al., 2009).

Esta banda estreita é típica de GNP mono-dispersa e esférica (Aromal e Green, 2012). A análise de absorção atômica revela uma concentração de ouro de 36 ppm. A imagem da TEM (Fig. 3) mostra predominantemente nanopartículas de ouro quase esféricas e estreita distribuição de tamanho e um diâmetro médio de 30 nm. Como se vê na figura 4, a análise XRD das nanopartículas realizada entre 30-70°, mostrou um grande pico próximo de 38° (111) e dois menores (200) e (220), correspondendo a reflexão de Bragg (JCPDS número 4-0784). O pico (111) foi utilizado para estimar o tamanho médio das nanopartículas, empregando a equação de Sherrer. O tamanho médio obtido, 29 nm, está muito próximo do valor de imagens de TEM. Além disso, as reflexões (111), (200) e (220) sugerem uma estrutura de ouro metálico com face cúbica centrada.

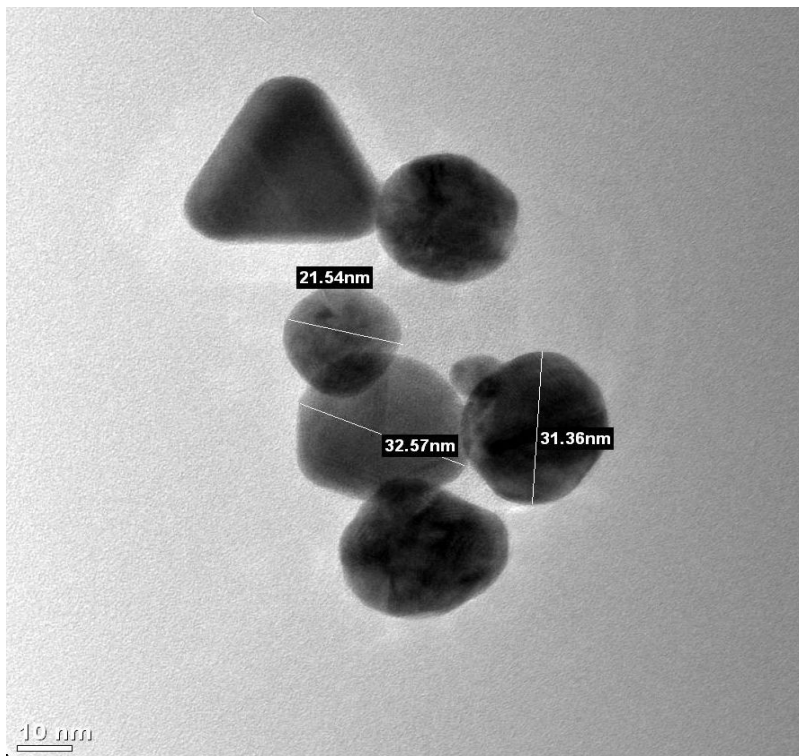


Figura 3. Caracterização das nanopartículas. Imagem representada por análise de microscopia eletrônica de transmissão das nanopartículas de ouro (300 kV).

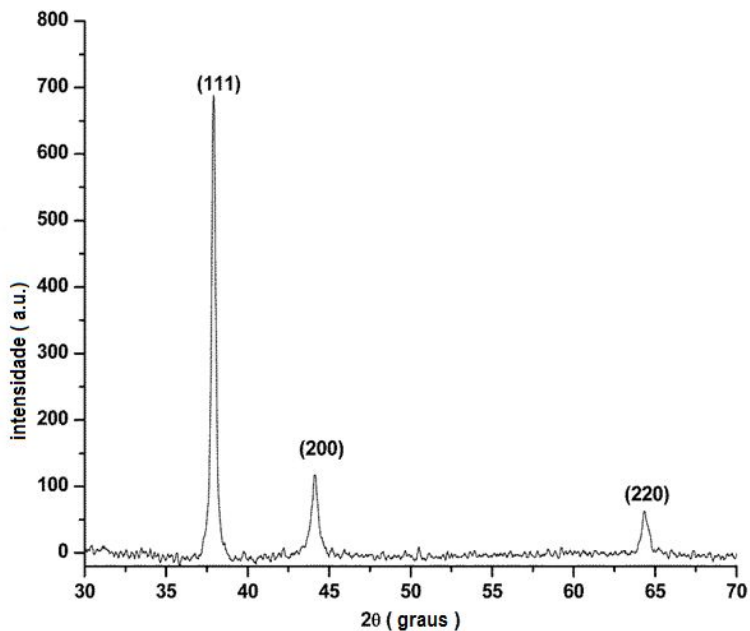


Figura 4. Caracterização das nanopartículas. Espectro de difração de raios-X das nanopartículas.

4.2 EFEITOS DAS GNP NOS MARCADORES INFLAMATÓRIOS EM EIU

Como mostra a figura 4 houve um aumento significativo dos níveis de $\text{TNF-}\alpha$, e da atividade da mieloperoxidase no humor aquoso após a administração de LPS. Todos os tratamentos foram efetivos em diminuir os níveis de $\text{TNF-}\alpha$ (Fig. 5), mas o efeito da GNP foi mais pronunciado quando comparado com o GS (Fig. 5). A administração de GNP, mas não de GS e prednisolona, foi capaz de reduzir significativamente a atividade da mieloperoxidase (Fig. 6) quando comparado ao grupo injetado com LPS.

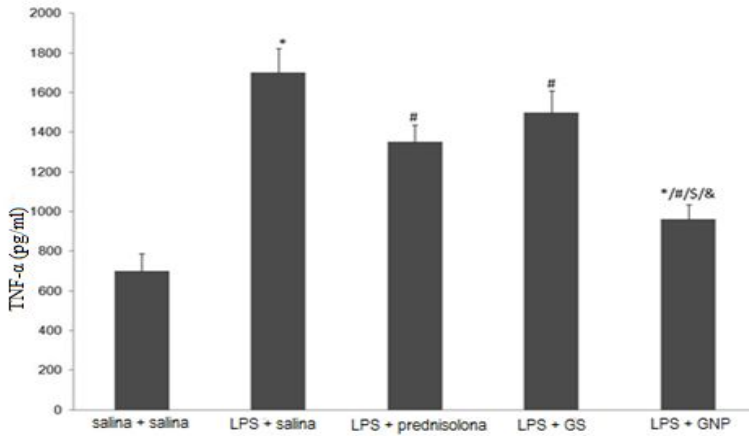


Figura 5. Efeitos da GNP ou prednisolona ou GS nos níveis de TNF- α no humor aquoso 24 horas após a administração de LPS. Os dados são expressos em significância \pm SD ($P < 0.05$). *Diferença de salina + salina. # Diferença de LPS + salina. \$ Diferença de LPS + prednisolona. & Diferença de LPS + GS.

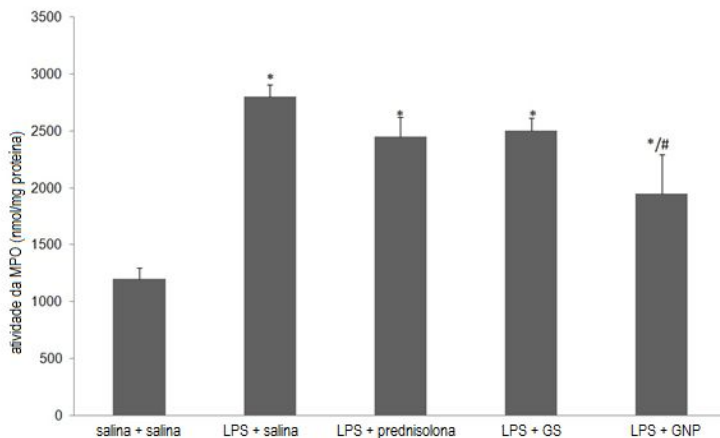


Figura 6. Efeitos da GNP ou prednisolona ou GS na atividade de mieloperoxidase no humor aquoso 24 horas após a administração de LPS. Os dados são expressos em significância \pm SD ($P < 0.05$). *Diferença de salina + salina. # Diferença de LPS + salina. \$ Diferença de LPS + prednisolona. & Diferença de LPS + GS.

4.3 EFEITOS DAS GNP EM DANO OXIDATIVO INDUZIDOS NA ÍRIS POR EIU

A administração de LPS resultou num aumento dos níveis de TBARS (Fig. 7) e proteínas carbonil (Fig. 8) nas íris. Ambas GNP e prednisolona, mas não o GS, foram capazes de reduzir o dano oxidativo na íris induzido pelo LPS.

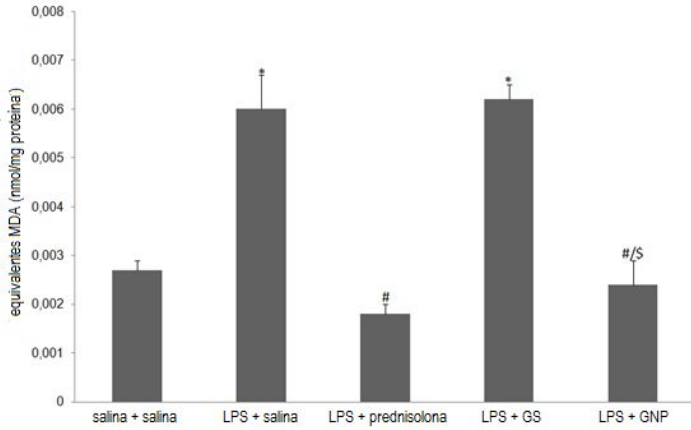


Figura 7. Efeitos da GNP ou prednisolona ou GS nos níveis de TBARS na íris 24 horas após a administração de LPS. Os dados são expressos em significância \pm SD ($P < 0.05$). *Diferença de salina + salina. # Diferença de LPS + salina. \$ Diferença de LPS + prednisolona. & Diferença de LPS + GS.

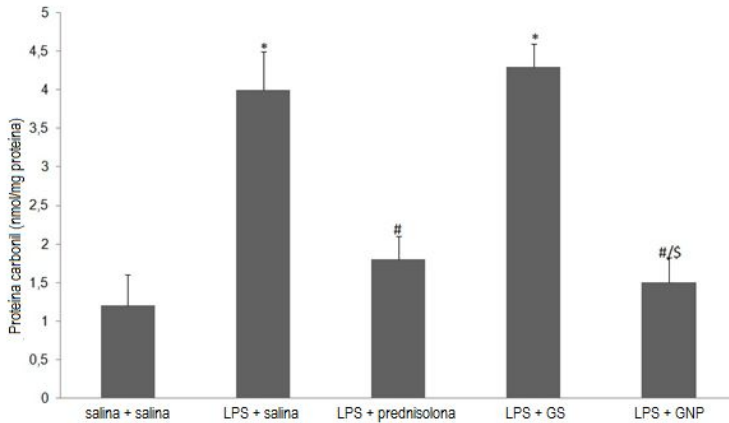


Figura 8. Efeitos da GNP ou prednisolona ou GS nos níveis de proteína carbonil na íris 24 horas após a administração de LPS. Os dados são expressos em significância \pm SD ($P < 0.05$). *Diferença de salina + salina. # Diferença de LPS + salina. \$ Diferença de LPS + prednisolona. & Diferença de LPS + GS.

4.4 EFEITOS DAS GNP NOS NÍVEIS DE TLR4 E ATIVAÇÃO DE NF- κ B

Uma vez que a GNP exercem um efeito anti-inflamatório neste modelo, foi decidido verificar se este efeito envolve, pelo menos em parte, a regulação negativa da ativação do TLR4 e do NF- κ B. A administração de LPS aumentou os níveis de TLR4 e a GNP foi capaz de atenuá-lo (Fig. 9) e também diminuir a translocação nuclear do NF- κ B (Fig. 10).

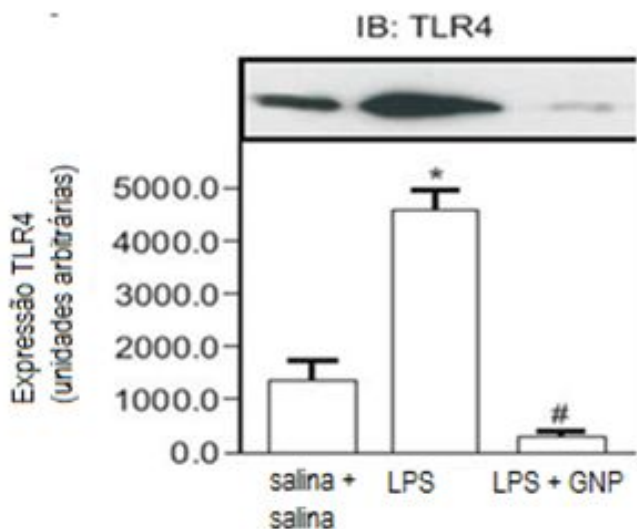


Figura 9. Efeitos da GNP nos níveis de TLR em amostras de íris 24 horas após a administração de LPS. Os dados são expressos em significância \pm SD ($P < 0.05$). *Diferença de salina + salina. # Diferença de LPS + salina.

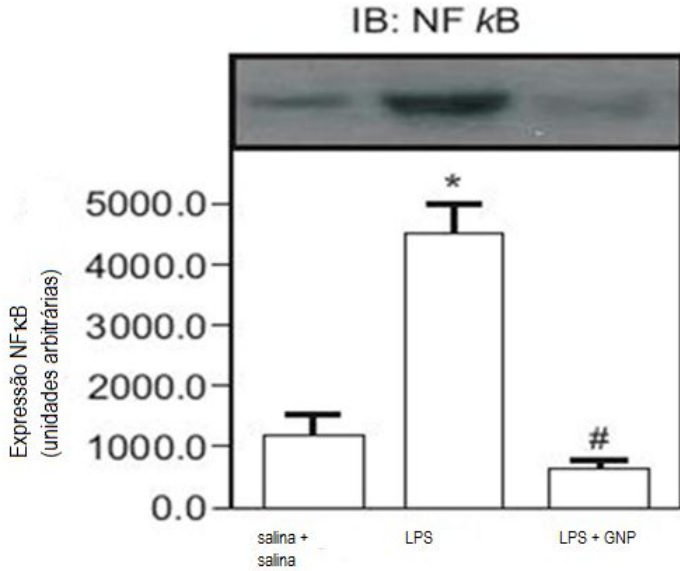


Figura 10. Efeitos da GNP nos níveis de NF- κ B em amostras de íris 24 horas após a administração de LPS. Os dados são expressos em significância \pm SD ($P < 0.05$). *Diferença de salina + salina. # Diferença de LPS + salina.

4.5 EFEITOS DAS GNP NOS NÍVEIS DE VEGF NA RETINA

Como mostra a figura (11) houve um aumento significativo nos níveis de VEGF na retina dos animais expostos ao LPS, e isto foi relacionado ao aumento dos níveis da atividade da MPO no humor aquoso ($r=0.87$, $p<0.001$). Diferentemente da nossa hipótese primária nenhum dos tratamentos foram capazes de diminuir os níveis de VEGF na retina, na realidade, o GS aumentou os níveis de VEGF (figura 11).

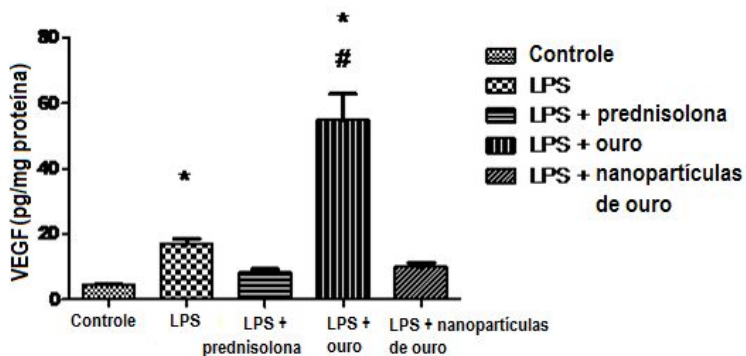


Figura 11. Efeitos das GNP ou prednisolona ou GS nos níveis de VEGF na retina 24 horas após a administração de LPS. Os dados são expressos em significância \pm SD. *Diferença do controle. # Diferença do LPS.

Já que a maioria dos efeitos do VEGF é mediado pela sua ligação ao VEGFR2 foram determinados os níveis de VEGFR2 nestes animais, mas não há diferença significativa nos seus níveis quando comparado os controles animais injetados com LPS além de nenhum efeito significativo de qualquer tratamento (dados não mostrados).

5. DISCUSSÃO

Nesse estudo a administração de GNP com 30-nm 2 horas após a injeção de LPS reduziu significativamente os parâmetros inflamatórios e os danos oxidativos no olho, exceto os níveis de VEGF e VEGFR2 na retina. Além disso, GNP parecem ser semelhantes à prednisolona 1% neste modelo.

No presente estudo a uveíte foi induzida pela administração de LPS e foram encontrados efeitos semelhantes aos de Pereira et al. (2009), isto é: a injeção de LPS induziu alterações inflamatórias no humor aquoso determinado pelo aumento dos níveis de TNF- α e a atividade da mieloperoxidase. Em adição induziu danos oxidativos na íris observados pelo aumento dos níveis de TBARS e Proteína Carbonil. Além disto os níveis de VEGF aumentaram significativamente na retina. Neste estudo os níveis de TNF- α e a atividade da mieloperoxidase, bem como os níveis de TBARS e Proteína Carbonil, mas não os níveis de VEGF, foram reduzidos com a administração de GNP semelhantes ao uso do RC-3095 por Pereira et al. (2009), sendo ambos mais eficazes que os glicocorticoides. O LPS estimula diversas células a produzir citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α (Hoekzema et al., 1992; De Vos et al., 1994; Haddad et al., 2002; Bucolo et al., 2003; Harrison et al., 2004; Chi et al., 2004) e neste momento ocorre quebra da barreira hemato-aquosa sendo a inflamação ocular instalada (Spinelli e Krohn, 1980; Gelatt, 1999; Rosenbaum et al., 2008). No presente estudo a concentração de TNF- α foi elevada no humor aquoso 24h após a administração do LPS. Nossos achados foram consistentes com relatos de outros (De Voz et al., 1994; Zang et al., 2003) e prévios estudos (Chi et al., 2004), comprovando que em nosso modelo a uveíte foi instalada.

Os corticosteróides são considerados o tratamento padrão para uveíte, contudo eles frequentemente apresentam efeitos colaterais limitando o seu uso. Quando são administrados em uma doença inflamatória ocular ou sistêmica, efeitos colaterais como glaucoma e catarata podem ocorrer (Kenneth et al., 2006). Do mesmo modo o uso de ouro e outros metais pesados levam a alguns efeitos colaterais indesejáveis (Brown et al., 2006). Portanto várias propostas estão sendo estudadas para prevenir a inflamação ocular em animais de experimento (Noda et al., 2008; Pereira et al., 2009; Wang et al., 2012). No artigo de Brown et al. (2006), as nanopartículas de ouro 27nm (ouro coloidal) foram consideradas aproximadamente 1000 vezes mais potentes no tratamento da artrite induzida em modelo de rato e possivelmente sem

os efeitos colaterais comparado com o aurotiomalato de sódio, administradas subcutaneamente (Brown et al., 2006). No presente estudo a fim de minimizar os efeitos colaterais deletérios da terapia com ouro e corticosteroides bem como manter a eficácia anti-inflamatória, foi explorado o potencial farmacológico das nano partículas de ouro em animais modelo de uveíte. As nano partículas de ouro tipicamente menores que 58 nm de tamanho atingem diversos órgãos através do sangue (Brown et al., 2006). É possível que as GNP (30 nm) tenham chegado ao local afetado após instilação nos olhos não só diretamente, mas também pelo sangue, podendo então levar a alguns efeitos colaterais sistêmicos que não foram aqui pesquisados, porém esses efeitos provavelmente são bem menores já que a concentração da suspensão no sangue também supostamente seria menor.

O mecanismo exato de ação anti-inflamatório das GNP na uveíte ainda não é conhecido, mas acredita-se assim como Pereira et.al. (2009) com o RC-3095 que a via de sinalização TLR4-NF- κ B está envolvida no processo (Pereira et al., 2009). Foi mostrado aqui um decréscimo nos níveis de proteínas TLR4 após o tratamento com GNP em modelo animal de EIU e uma consequente redução do conteúdo de NF- κ B no núcleo.

Recentes pesquisas em particular por Chang et al. (2004) e Li et al. (2010), sugerem que a via de sinalização TLR4 pode estar envolvida na patogênese da uveíte (Chen et al., 2005; Li et al., 2010; Xu et al., 2010; Wang et al., 2011). Os receptores Toll-like (TLRs) são uma família recentemente descoberta de receptores de reconhecimento da imunidade inata (PRRs). O sistema imune inato é rapidamente ativado pelo reconhecimento de micro organismos patogênico e especialmente por uma estrutura da parede celular que é altamente conservada por (do inglês “pathogen-associated molecular patterns”) (PAMPs) (Janssens e Beyaert, 2003; Takeda et al., 2003; Takeda et al., 2005; Chang et al., 2006).

Há dados de que pelo menos treze TLRs humanos foram identificados, sendo que o TLR4 é o mais antigo descoberto e o mais estudado. A principal função do TLR4 é identificar a parede celular da bactéria gram-negativa do LPS e ativar o sistema imune inato (Li et al., 2010). A expressão de TLR4 foi demonstrada em macrófagos, monócitos do sangue periférico, células dendríticas, e células do endotélio vascular da derme bem como em vários tecidos (Abbas e Lichtman, 2005).

Wang et al. (2011), demonstraram que a expressão de TLR4 nos macrófagos da íris está aumentada durante a EIU. Li et al. (2010),

mostraram que a resposta inflamatória atingiu o máximo 24 horas após a administração de LPS em EIU com níveis aumentados de TLR4 na íris. Neste estudo os níveis de TLR4 e NFκB estavam também aumentados 24h após injeção do LPS, isto sugere que o TLR4 pode estar envolvido na patogênese da uveíte.

A Ativação do TLR4 pelo LPS resulta na ativação do fator de transcrição NF-κB, através de uma via de sinalização intracelular imunoestimulante (Wang et al., 2012). Ma et al. (2010), mostraram que as GNP suprimiram a ativação do NF-κB induzida pelo LPS em células RAW264.7 através da inibição da atividade AKt. As GNP também inibiram a fosforilação da transdução do sinal e o ativador de transcrição 1 (STAT1) induzidos pelo LPS através da regulação negativa da expressão do interferon-beta (IFN-β).

A MPO representa índices de maior atividade leucocitária, e é uma enzima contida nos grânulos primários (azurófilos) dos neutrófilos (Klebanoff e Clark, 1978; Moberg et al., 1983; Matthews et al., 1985; Nakamuta et al., 1993; Kirsch et al., 2000). Mais de 95% da MPO está presente nos grânulos dos neutrófilos, existindo os restantes 5% nos monócitos circulantes (Bos et al., 1987).

A MPO é uma proteína catiônica, com peso molecular de 144 kD, que consiste em dois dímeros idênticos ligados por uma ponte de bissulfeto, sendo cada dímero composto de uma subunidade de cadeia leve e uma pesada, com grupos heme funcionalmente idênticos. É o principal constituinte dos grânulos azurófilos dos neutrófilos, prontamente liberada após ativação por diferentes agonistas, contribuindo para a defesa imune inata do organismo (Arnhold, 2004, Hansson et al., 2006, Lau e Baldus, 2006).

A síntese de MPO ocorre durante a diferenciação mielóide na medula óssea e está completa dentro dos granulócitos previamente à sua entrada na circulação. Essa enzima é encontrada predominantemente em neutrófilos, monócitos e alguns subtipos de macrófagos teciduais. Representa mais de 5% do conteúdo proteico total da célula em neutrófilos e 1% nos monócito (Hansson et al., 2006). Esta enzima catalisa a oxidação de substâncias na presença de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e de um halogênio, constituindo a ligação peróxido de hidrogênio--halogênio-MPO um sistema altamente tóxico para os microorganismos (Moberg et al., 1983). Os grânulos dos neutrófilos contendo MPO são libertados mediante estimulação por imunocomplexos por catecolaminas ou durante a morte celular (Klebanoff et al., 1976; Johnson et al., 1987; Nakamuta et al., 1993).

A MPO é responsável pela quase totalidade da atividade epinefrina oxidase do plasma (EO) que oxida a epinefrina a adrenocrômio (Matthews et al., 1985), num processo que envolve a geração de formas reativas de oxigênio (Misra e Fridovich, 1972; Powis, 1979).

A ativação do NF- κ B resulta consequentemente na indução de diversas citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, e atividades antimicrobianas iniciando uma rápida resposta inflamatória caracterizada pelo recrutamento de leucócitos para o sítio de infecção para eliminar o patógeno invasor (Abbas e Lichtman, 2005). Dentre estes mediadores inflamatórios, o TNF- α atingiu um pico de concentração nas fases iniciais da inflamação, assim, desempenha um papel importante no desenvolvimento da resposta inflamatória. Estudos relataram que a concentração de TNF- α no humor aquoso de pacientes com uveíte foram significativamente maiores do que no grupo controle normal. (Santos-Lacomba et al., 2001; Pérez-Guijo et al., 2004). Neste modelo, a administração do GNP atenuou os níveis de TNF- α no humor aquoso e este efeito foi semelhante ao da prednisolona e superior ao GS.

Os corticóides podem paradoxalmente regular para cima (positiva) alguns aspectos da resposta inflamatória (Curnow et al., 2004; Pereira et al., 2009). Koizumi et al. (2003), mostraram que a administração de um inibidor de TNF- α reduz significativamente a rolagem e aderência de leucócitos em EIU e de acordo com os dados deste estudo foi encontrado um aumento da atividade da mieloperoxidase como um indicativo de infiltração de neutrófilos no humor aquoso e a administração da GNP, mas não a de prednisolona e GS, foi eficaz em diminuir ligeiramente estes níveis, exceto os níveis de VEGF. Neste contexto, Elgebaly et al. (1994), demonstraram que os glicocorticóides não foram capazes de diminuir a infiltração de neutrófilos em córneas lesadas por peróxido de hidrogênio. O afluxo de neutrófilos para a câmara anterior é dependente da produção local de quimiocinas (Kenneth et al., 2006), assim nós supomos que as nano partículas de ouro, mas não a prednisolona e GS, podem diminuir a produção de quimiocinas, apresentando, assim, mais um importante efeito anti-inflamatório quando comparado com a prednisolona e GS.

Quando o oxigênio é parcialmente reduzido, tanto na fosforilação oxidativa quanto em outras reações, há formação de radicais livres, que constituem moléculas com coexistência independente (o que explica o uso do termo “livre”) e que contém um ou mais elétrons não pareados na camada de valência. Esta configuração faz dos radicais livres espécies altamente instáveis, de meias-vidas relativamente curtas e quimicamente

muito reativas (Ferreira e Matsubara, 1997). O estresse oxidativo no ambiente celular resulta da hidroxidação de lipídios altamente reativos e instáveis (Yagi, 1988; Armstrong e Browne, 1994). A instável decomposição de peróxidos derivados de ácidos graxos poliinsaturados resulta na formação do MDA (Alexandrova e Bochev, 2005; Cherubini et al., 2005), que pode ser quantificado colorimetricamente pelas TBARS. Este é um método bem estabelecido para o acompanhamento da peroxidação de lipídios (Yagi, 1988; Armstrong e Browne, 1994). As espécies reativas do oxigênio (ERO) podem danificar todos os tipos de moléculas biológicas, sendo as proteínas alvos imediatos para a modificação oxidativa. O dano à estrutura proteica pode alterar sua atividade biológica, sendo que no caso de enzimas, poderia resultar em modificação de sua atividade catalítica. Além disso, estas alterações ainda poderiam causar prejuízo no transporte ativo através das membranas celulares e citólise (Dean et al., 1997). A formação da proteína carbonil parece ser um fenômeno comum durante a oxidação, e sua quantificação pode se usada para medir a extensão do dano oxidativo (Berlett e Stadman, 1997; Beal et al., 2003; Donne et al., 2003).

Vários trabalhos demonstraram que a produção de espécies reativas, tais como o radical anion superóxido (O_2^-), H_2O_2 , radical hidroxila (OH^-), e peroxinitrito (NOO^-) ocorrem no local da inflamação e contribuem para o dano do tecido (Cuzzocrea et al., 2001; Salvemini et al., 2001). Espécies reativas de oxigênio (ROS) poderiam ser mediadores da inflamação induzida por citocinas e quimiocinas, que por sua vez induzem à geração de ROS intracelular por reação em cadeia respiratória mitocondrial, reação metabólica araquidônica, e a geração do superóxido pela enzima NADPH oxidase ligada a membrana. Além disso, ROS ativam fatores de transcrição redox-sensíveis, tais como NF- κ B e AP-1, que desempenham um papel central e crucial na inflamação do trato uveal (Rocksén et al., 2000). O tratamento com GNP resultou na redução do dano oxidativo na íris após LPS, este efeito poderia ser um resultado da redução da ativação de macrófagos, (Larsen et al., 2008) que são a principal fonte de ROS durante a inflamação (Cuzzocrea et al., 2001; Salvemini et al., 2001; Dringen, 2005; Dheen et al., 2007). Além disso, as ROS derivadas dos macrófagos são parcialmente mediadas pelo TNF- α , que estimulam a produção de ROS iniciando a translocação nuclear do NF- κ B, com a indução subsequente da sintase de óxido nítrico indutível e ciclooxigenase 2 (Caso et al., 2006; Madrigal et al., 2006; Guggilam et al., 2007). O ouro contém compostos que inibem a ligação do DNA ativando NF- κ B e a atividade

da $\text{I}\kappa\text{B}$ -kinase *in vitro* (Bratt et al., 2000; Burmester, 2001; Yamashita et al., 2003; Milacic et al., 2006; Milacic et al., 2008). Estes mecanismos poderiam explicar tanto a redução de $\text{TNF-}\alpha$ como os efeitos antioxidantes observados neste estudo, uma vez que o $\text{NF-}\kappa\text{B}$ está envolvido na ativação dos macrófagos (Kauppinen e Swanson, 2005; Dheen et al., 2007), formação das ROS derivadas do macrófagos (Nam et al., 2008) e a regulação da transcrição das citocinas inflamatórias (Mattson e Camandola, 2001 Mémet, 2006; Dheen et al., 2007; Nam et al., 2008). É também possível que os cations de ouro possam interagir diretamente com as ROS e / ou regular o estado redox das células, os íons de ouro influenciam na redox das enzimas mitocondriais, respiração oxidativa, e das propriedades da permeabilidade da membrana (Pillarsetty et al., 2003; Zhang e Lippard, 2003; Rigobello et al., 2004a; Rigobello et al., 2004b).

Como a estrutura colagenosa da esclera e o envoltório pela episclera são comparados à constituição sinovial, sugerindo analogia do olho com articulação esferoidal (Foster et al., 1999), e sabendo-se que não há nenhum trabalho estudando GNP em uveíte até o momento, procurou-se fazer analogia dos nossos resultados com modelos de artrite. Neste estudo as GNP foram capazes de reduzir todos os marcadores inflamatórios, com exceção dos níveis de VEGF, o que foi uma surpresa, pois se esperava que os resultados fossem semelhantes ao estudo das nanopartículas de ouro em ratos modelo de artrite de Tsai et al. (2007) e retinopatia da prematuridade de Kim et al. (2011). No estudo deles foi demonstrado que as GNP exercem atividade anti-angiogênica e subsequentemente reduzem a inflamação e a infiltração dos macrófagos. O mecanismo que explica o efeito anti-inflamatório é: Uma vez que o ouro se liga fortemente a tióis e aminas (Porter et al., 1988; Selvakannan et al., 2003), o nano ouro inibe a proliferação das células endoteliais induzidas pelo VEGF125 através da interação do balanço enxofre/aminas presentes em seus domínios de ligação com a heparina, e portanto inibe a sinalização induzida pelo VEGF165 (Arnett et al., 1988; Bhattacharya et al., 2004). Além disso, o nano ouro inibe a permeabilidade induzidas pelo VEGF em modelos tumor de orelha e tumor de ovário em ratos (Bhattacharya et al., 2004). Portanto o nano ouro tem efeitos anti-angiogênicos e pode ser benéfico no tratamento da artrite (Tsai et al., 2007).

A habilidade das GNP de se ligar ao VEGF parece estar relacionada ao seu tamanho e carga (Arnett et al., 1988; Bhattacharya et al., 2004). Quando comparado partículas de 5 a 20 nm de diâmetro foi mostrado que as partículas maiores tem um efeito máximo (completa

inibição), enquanto que as nanopartículas de 5 nm exibiram um modesta inibição (25%) na atividade *in vitro* do VEGF (Arnett et al., 1988; Bhattacharya et al., 2004). Neste estudo foi usado GNP por volta de 29 nm e não foi encontrado qualquer evidencia na literatura com esse tamanho que ligue as GNP ao VEGF, assim pode-se postular que as partículas eram muito grandes para interagir com o VEGF. Além disso, demonstrou-se que a modificação na superfície das GNP com varias cargas ligadas inibe sua habilidade de ligar-se ao VEGF enfatizando o papel das nanopartículas com superfície livre. Além disso, não foi medida a concentração de ouro na retina, então não é possível afirmar que as GNP podem realmente chegar à retina para promover uma redução nas concentrações de VEGF.

Foi encontrada uma relação significativa entre o VEGF na retina e a atividade da MPO, sugerindo que algumas células inflamatórias do humor aquoso atravessam a barreira hemato-retiniana (Koizumi et al., 2003). Entretanto, uma vez que foi previamente demonstrado que as GNP podem diminuir a atividade da mieloperoxidase seria provável que ela diminuísse os níveis de VEGF, mas isto não ocorreu. O mais provável é que as células inflamatórias venham da região da íris e corpo ciliar e promovam a inflamação da retina que é seguida pelo aumento dos níveis de VEGF (Zhang et al., 2009).

A angiogênese é reconhecida como um evento chave na formação e manutenção do pannus na artrite reumatoide (AR), particularmente nos estágios iniciais da doença (FitzGerald et al., 1991; Folkman, 1995; Koch, 2003). Os neovasos formados promovem a persistência da inflamação sinovial pelo transporte das células inflamatórias para o sítio da sinovite na AR, bem como o suplemento de nutrientes e oxigênio para hiperplasia sinovial. No início a angiogênese está associada à expressão de diversos fatores angiogênicos na AR (Paleolog, 2002.; Szekanecz, 2005), entre os quais o VEGF desempenha um papel crucial na neovascularização durante a formação do pannus (Fava et al., 1994; Koch et al., 1994; Lu et al., 2000).

Algumas limitações neste estudo devem ser apontadas. O estudo foi focado sobre os parâmetros de dano oxidativo e da resposta inflamatória, mas não em dados relativos a análises clínicas e histológicas, assim, não é possível determinar se as alterações observadas na resposta inflamatória contribuíram para uma melhora nos parâmetros clínicos com mais significância. Uma vez que a resposta inflamatória é a principal responsável pelos sintomas nas inflamações, acredita-se que as alterações observadas provavelmente induziriam melhoras nos sinais clínicos das uveítes. As doses das GNP foram

baseadas em estudos piloto, portanto não foi apresentado um estudo dose-resposta suficiente para analisar todos os parâmetros inflamatórios e oxidativos, e isso pode limitar uma comparação mais direta das GNP com os efeitos da prednisolona. Além disso, não foi medida a concentração de ouro em compartimentos diferentes do olho, então não é possível determinar a distribuição de ouro em diferentes estruturas do olho. Apesar disso, é bem conhecido que as GNP são prontamente difusíveis e podem ser distribuídas a vários componentes do olho (Kim et al., 2009). A toxicidade em longo prazo das GNP não é bem conhecida. Sugere-se que as GNP têm, em geral, baixa toxicidade aguda tanto *in vitro* como *in vivo*, e a sua toxicidade depende do tamanho das partículas, da concentração, e das propriedades da superfície (Bakri et al., 2008). Especificamente no olho há alguns trabalhos sobre a toxicidade das GNP. Em diferentes modelos animais de administração de GNP seja por via intravenosa, intravítrea ou corneana parecem não ter toxicidade evidente na retina e ou na córnea (Bakri et al., 2008; Kim et al., 2009; Khlebtsov e Dykman, 2011; Sharma et al., 2011).

6. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstra que as GNP podem ter efeitos anti-inflamatórios tópicos que são, pelo menos em parte, secundária a regulação negativa da via TLR4-NFκB em modelo de uveíte induzida por LPS. Apesar destas limitações, o nosso modelo foi útil na elucidação de uma variedade de mediadores que são ativados no olho e no teste de diversos inibidores com potencial farmacológico.

REFERÊNCIAS

- Abbas AK, Lichtman AH. *Imunologia Celular e Molecular*. Elsevier, 5ª edição, Rio de Janeiro. 2005; 251-270, 291-294.
- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Citocinas. In: *Imunologia celular e molecular*. 2ª ed. Rio de Janeiro: Revinter. 1998; 253-276.
- Abreu MT, Hirata PS, Belfort Jr R, Neto SD. Uveítes em São Paulo – Estudo epidemiológico, clínico e terapêutico. *Arq Bras Oftalmol*. 1980; 43: 10-16.
- Alexandrova ML, Bochev PG. Oxidative stress during the chronic phase after stroke. *Free Radic Biol Med*. 2005; 39: 297-316.
- Alivisatos AP, Johnsson KP, Peng X, Wilson TE, Loweth CJ, Bruchez JR MP, Schultz PG. Organization of “nanocrystal molecules” using DNA. *Nature*. 1996; 382: 609-611.
- Alivisatos P. The use of nanocrystals in biological detection. *Nat Biotechnol*. 2004; 22: 47-52.
- Armstrong D, Browne R. The analysis of free radicals, lipid peroxides, antioxidant enzymes and compounds to oxidative stress as applied to the clinical chemistry laboratory. *Free Radic Med Diag*. 1994; 366: 43-58.
- Aromal SA, Green DP. Synthesis of gold nanoparticles using *Trigonella foenumgraecum* and its size-dependent catalytic activity. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2012; 97: 1-5.
- Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SR, Liang MH, Luthra HS. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1988; 31: 315-324.
- Arnhold J. Free radicals – friends or foes? Properties, functions, and secretion of human myeloperoxidase. *Biochemistry*. 2004; 69: 4-9.
- Bajaj S, Vohora SB. Anti-cataleptic, anti-anxiety and anti-depressant activity. *Ind J Pharmacol*. 2000; 32: 339.

Bakri SJ, Pulido JS, Mukherjee P, Marler RJ, Mukhopadhyay D. Absence of histologic retinal toxicity of intravitreal nanogold in a rabbit model. *Retina*. 2008; 28:147-149.

Beal MF, Hyman BT, Koroshetz W. Do defects in mitochondrial metabolism underlie the pathology of neurodegenerative disease? *Trends Neurosci*. 2003; 16: 125-131.

Beinke S, Ley S. Functions of NF- κ B1 and NF- κ B2 in immune cell biology. *Biochem J*. 2004; 382: 393-409.

Berlett BS, Stadman ER. Protein oxidation in aging, disease and oxidative stress. *J Biol Chem*. 1997; 272: 20313-20316.

Bhattacharya R, Mukherjee P, Xiong Z, Atala A, Soker S, Mukhopadhyay D. Gold nanoparticles inhibit VEGF165-induced proliferation of HUVEC cells. *Nano Lett*. 2004; 4: 2479-2481.

Bhattacharya R, Patra CR, Earl A, Wang S, Katarya A, Lu L, Kizhakkedathu JN, Yaszemski MJ, Greipp PR, Mukhopadhyay D, Mukherjee P. Attaching folic acid on gold nanoparticles using noncovalent interaction via different polyethylene glycol backbones and targeting of cancer cells. *Nanomedical*. 2007; 3: 224-238.

Bingham CO. The pathogenesis of rheumatoid arthritis: pivotal cytokines involved in bone degradation and inflammation. *J Rheumatol*. 2002; 29 (65): 3-9.

Bos A, Vever R, Roos D. Characterization and quantification of the peroxidase in human monocytes. *Biochim Biophys Acta*. 1987; 525: 37-44.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976; 72: 248-254.

Brasier AR. "The NF- κ B regulatory network". *Cardiovasc Toxicol*. 2006; 6 (2): 111-130.

Bratt J, Belcher J, Vercellotti GM, Palmblad J. Effects of anti-rheumatic gold salts on NF-kappa B mobilization and tumour necrosis factor-alpha

(TNF-alpha)-induced neutrophil-dependent cytotoxicity for human endothelial cells. *Clin Exp Immunol.* 2000; 120: 79-84.

Brown CL, Bushell G, Whitehouse MM, Agrawal DS, Tupe SG, Paknikar KM, Edward RT. (i) The use of colloidal gold to treat experimentally-induced arthritis in rat models; (ii) Characterization of the gold in Swarna bhasma, a microparticulate used in traditional Indian medicine; Gold Presentation. *Nanogoldpharmaceutics.* 2006; 3: 245-250.

Bucolo C, Cuzzocrea S, Mazzon E, Caputi A. Effects of cloricromene, a coumarin derivative, on endotoxin-induced uveitis in Lewis rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003; 44: 1178-1184.

Burda C, Chen X, Narayanan R, El-Sayed MA. Chemistry and properties of nanocrystals of different shapes. *Chem Rev.* 2005; 105: 1025-1102.

Burmester GR. Molecular mechanisms of action of gold treatment in rheumatoid arthritis - an update. *Z Rheumatol.* 2001; 60: 167-173.

Caso JR, Lizasoain I, Lorenzo P, Moro MA, Leza JC. The role of tumor necrosis factor-alpha in stress-induced worsening of cerebral ischemia in rats. *Neuroscience.* 2006; 142: 59-69.

Chams H, Rostami M, Mohammadi SF, Ohno SH. Epidemiology and Prevalence of Uveitis: Review of Literature. *Iran J Ophthalmol.* 2009; 21(4): 4-16.

Chang JH, McCluskey P, Wakefield D. Expression of toll-like receptor 4 and its associated lipopolysaccharide receptor complex by resident antigen-presenting cells in the human uvea. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004; 45: 1871-1878.

Chang JH, Mc Cluskey PJ, Wakefield D. Toll-like receptors in ocular immunity and the immunopathogenesis of inflammatory eye disease. *Br J Ophthalmol.* 2006; 90: 103-108.

Chen W, Hu X, Zhao L, Shang Li, Hong Lu. Expression of toll-like receptor 4 in uvea-resident tissue macrophages during endotoxin-induced uveitis. *Mol Vis.* 2009; 15: 619-628.

Cherubini A, Riggiero C, Polidori C, Mecocci P. Potential markers of oxidative stress in stroke. *Free Radic Biol Med.* 2005; 39: 841-852.

Chi ZL, Hayasaka S, Zhang XY, Hayasaka Y, Cui HA. Effects of rolipram, a selective inhibitor of type 4 phosphodiesterase, on lipopolysaccharide-induced uveitis in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004; 45: 2497-2502.

Chircorian A, Barrios AM. Inhibition of lysosomal cysteine proteases by chrysotherapeutic compounds: a possible mechanism for the antiarthritic activity of Au(I). *Bioorg Med Chem Lett.* 2004; 14: 5113-5116.

Crispin SM. Uveitis in the dog and cat. *J Small Anim Pract.* 1988; 29: 429-447.

Curnow SJ, Wloka K, Faint JM, Amft N, Cheung CM, Savant V, Lord J, Akbar AN, Buckley CD, Philip MI, Salmon M. Topical glucocorticoid therapy directly induces up-regulation of functional CXCR4 on primed T lymphocytes in the aqueous humor of patients with uveitis. *J Immunol.* 2004; 172: 7154-7161.

Cuzzocrea S, Riley DP, Caputi AP, Salvemini D. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol Rev.* 2001; 53: 135-159.

Daniel MC, Astruc D. Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chem Rev.* 2004; 104: 293-346.

De Lêdo JCS, Hossne WS, Pedroso MZ. Introdução às questões bioéticas suscitadas pela nanotecnologia. *Bioethikos- Centro Universitário São Camilo - São Paulo,* 2007; 1(1): 61-67.

De Souza CT, Gasparetti AL, Pereira-da-Silva M, Araujo EP, Carvalheira JB, Saad MJ, Boschero AC, Carneiro EM, Velloso LA. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1-dependent uncoupling protein-2 expression in pancreatic islets of rats: a novel pathway for neural control of insulin secretion. *Diabetologia.* 2003; 46: 1522-1531.

De Vos AF, Van Haren MA, Verhagen C, Hoekzema R, Kijlstra A. Kinetics of intraocular tumor necrosis factor and interleukin-6 in

endotoxin induced uveitis in the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1994; 35: 1100-1106.

De Wall SL, Painter C, Stone JD, Bandaranaayake R, Wiley DC, Mitchison TJ, Stern LJ, De Decker BS. *Nat Chem Biol.* 2006; 2: 197.

De Young LM, Kheifets JB, Ballaron SJ, Young JM. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. *Agents Actions.* 1989; 26: 335-341.

Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J.* 1997; 324: 1-18.

Dheen ST, Kaur C, Ling EA. Microglial activation and its implications in the brain diseases. *Curr Med Chem.* 2007; 14: 1189-1197.

Dick AD. Immune mechanisms of uveitis: insights into disease pathogenesis and treatment. *Int Ophthalmol Clin.* 2000; 40(2): 1-18.

Donne ID, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta.* 2003; 329: 23-38.

Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1990; 186: 421-431.

Dringen R. Oxidative and antioxidative potential of brain microglial cells. *Antioxid Redox Signal.* 2007; 7: 1223-1233.

Eisler R. Chrysotherapy: a synoptic review. *Inflamm Res.* 2003; 52: 487-501.

Elgebaly SA, Miano D, Ehlers W, Rahhal F, Tyles E, El-Kerm AF. The induction of anterior chamber inflammation by factors released from hydrogen peroxide-injured corneas: effect of dexamethasone and indomethacin. *J Ocul Pharmacol.* Spring 1994; 10(1): 295-306.

Fava RA, Olsen NJ, Spencer-Green G, Yeo KT, Yeo TK, Berse B, Jackman RW. Vascular permeability factor/endothelial growth factor:

accumulation and expression in human synovial fluids and rheumatoid synovial tissue. *J Exp Med.* 1994; 180: 341-346.

Felson DT, Anderson JJ, Meenan RF. The comparative efficacy and toxicity of second-line drugs in rheumatoid arthritis. Results of two metaanalyses, *Arthritis Rheum.* 1990; 33: 1449-1461.

Fernandes LC, Campos GS, Oréfice F. Epidemiologia das uveítes. In: Oréfice F, ed. *Uveíte clínica e cirúrgica.* Rio de Janeiro: Cultura Médica. 2005; 1: 45-57.

Fernandes LC, Oréfice F. Aspectos clínicos e epidemiológicos das uveítes, em serviços de referência em Belo Horizonte, de 1970 a 1993. *Rev Bras Oftal.* 1996; 55: 9-32.

Ferreira A, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Ass Méd Bras.* 1997; 43: 61-68.

FitzGerald O, Soden M, Yanni G, Robinson R, Bresnihan B. Morphometric analysis of blood vessels in synovial membranes obtained from clinically affected and unaffected knee joints of patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 1991; 50: 792-796.

Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med.* 1995; 1: 27-31.

Foster CS, Maza MS, Sangwan V, Watson PG, Pavésio C. Scleritis diagnosis and treatment. In: *Annual Meeting. American Academy of Ophthalmology.* Orlando, Flórida. 1999; 24-27.

Fricke SP, Buckley RG. Comparison of two colorimetric assays as cytotoxicity endpoints for an in vitro screen for antitumour agents. *Anticancer Res.* 1996; 16: 3755-3760.

Gardiner AM, Armstrong RA, Dunne MC, Murray PI. Correlation between visual function and visual ability in patients with uveitis. *Br J Ophthalmol.* 2002; 86(9): 993-996.

Gasparin F, Takahashi B S, Scolari MR, Gasparin F, Pedral LS, Damico FM. Experimental models of autoimmune inflammatory ocular diseases. *Arq Bras Oftalmol.* 2012; 75 (2): 143-147.

Gelatt KN. (Ed.). *Veterinary ophthalmology.* Philadelphia: Lippincott Williams, Willkins. 1999; 1544p.

Gilmore TD. "Introduction to NF- κ B: players, pathways, perspectives". *Oncogene.* 2006; 25 (51): 6680-6684.

Giroir BP. Mediators of septic shock: New approaches for interrupting the endogenous inflammatory cascade. *Crit Care Med.* 1993; 21: 780-789.

Gloire G, Legrand-Poels S, Piette J. NF- κ B activation by reactive oxygen species : Fifteen years later . *Biochem Pharmacol.* 2006; 72: 1493-1505.

Guggilam A, Haque M, Kerut EK, McIlwain E, Lucchesi P, Seghal I, Francis J. TNF-alpha blockade decreases oxidative stress in the paraventricular nucleus and attenuates sympathoexcitation in heart failure rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007; 293: 599-609.

Haddad JJ, Land SC, Tarnow-mordi WO, Zembala M, Kowalczyk D, Lauterbach R. Immunopharmacological potential of selective phosphodiesterase inhibition. Differential regulation of lipopolysaccharide- mediated proinflammatory cytokine (interleukin-6 and tumor necrosis factor- α) biosynthesis in alveolar epithelial cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002; 300: 559-566.

Hamblin AS. *Cytokines and cytokine receptors.* 2nd ed. New York: Oxford University Press. 1993; 24-25.

Han G, Ghosh P, Rotello VM. Functionalized gold nanoparticles for drug delivery. *Nanomedical.* 2007; 2: 113-123.

Han S, Kim K, Kim H, Kwon J, Lee YH, Lee CK, Song Y, Lee SJ, Ha N, Kim K. Auranofin inhibits overproduction of pro-inflammatory cytokines, cyclooxygenase expression and PGE2 production in macrophages. *Arch Pharm Res.* 2008; 31: 67-74.

Hansson M, Olsson I, Nauseef WM, Biosynthesis, processing, and sorting of human myeloperoxidase. *Arch Biochem Biophys.* 2006; 445: 214-224.

Harrison LM, Van Haaften WCE, Tesh VL. Regulation of proinflammatory cytokine expression by Shiga toxin 1 and/or lipopolysaccharides in the human monocytic cell line THP-1. *Infect Immun.* 2004; 72: 2618-2627.

Higby GJ, Gold in medicine: a review of its use in the West before 1900. *Gold Bull.* 1982; 15: 130-140.

Hirsch LR, Jackson JB, Lee A, Halas NJ, West JL. A whole blood immunoassay using gold nanoshells. *Anal Chem.* 2003a; 75: 2377-2381.

Hirsch LR, Stafford RJ, Bankson JA, Sershen SR, Rivera B, Price RE, Hazle JD, Halas NJ, West JL. Nanoshell-mediated near-infrared thermal therapy of tumors under magnetic resonance guidance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003b; 100: 13549-13554.

Hoekzema R, Verhagen C, Van Haren M, Kijlstra A. Endotoxin-induced uveitis in the rat. the significance of intraocular interleukin-6. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1992; 33: 532-539.

Jabs DA, Rosenbaum JT, Foster CS, Holland GN, Jaffe GJ, Louie JS, Nussenblatt RB, Stiehm ER, Tessler H, Van Gelder RN. Guidelines for the use of immunosuppressive drugs in patients with ocular inflammatory disorders: recommendations of an expert panel. *Am J Ophthalmol.* 2000; 130(4): 492-513.

Janssens S, Beyaert R. Role of Toll-like receptors in pathogen recognition. *Clinical Microbiology Reviews.* 2003; 16(4): 637-646.

Johnson RJ, Couser WG, Chi EY, Adier S, Klebanoff S. New mechanism for glomerular injury: myeloperoxidase-hydrogen peroxidase-halide system. *J Clin Invest.* 1987; 79: 1379-1387.

Kahn HA, Moorhead HB. Statistics on blindness in the model reporting area; 1969-1970. US Department of Health, Education and Welfare Publication NIH. 1973; 73-427.

Kara-José N, Carvalho KMM, Pereira VL, Venturini NHB, Gasparetto MEFR, Guchiken MT. Estudo retrospectivo dos primeiros 140 casos atendidos na clínica de visão sub-normal do Hospital das Clínicas da Unicamp. *Arq Bras Oftalmol.* 1988; 51: 65-69.

Kauppinen TM, Swanson RA. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 promotes microglial activation, proliferation, and matrix metalloproteinase-9-mediated neuron death. *J Immunol.* 2005; 174: 2288-2296.

Kean WF, Forestier F, Kassam Y, Buchanan WW, Rooney PJ. The effect of gold sodium thiomalate and auranofin on lipopolysaccharide-induced interleukin-1 production by blood monocytes in vitro: variation in healthy subjects and patients with arthritis. *Semin Arthritis Rheum.* 1985; 14: 180.

Kenneth GJ, Ooi M, Galatowicz G, Calder VL, Susan L, Lightman SL. (FRCP, FRCOphth, FRCP eds.), *FmedSci. Cytokines and Chemokines in Uveitis-Is there a correlatinon with clinical phenotype?* *Clin Med Res Marshfield Clinic.* 2006; 4 (4): 294-309.

Khlebtsov N, Dykman L. Biodistribution and toxicity of engineered gold nanoparticles: a review of in vitro and in vivo studies. *Chem Soc Rev.* 2011; 40:1647-1671.

Kim EC, Foster CS. Immunomodulatory therapy for the treatment of ocular inflammatory disease: evidencebased medicine recommendations for use. *Int Ophthalmol Clin.* 2006; 46(2): 141-164.

Kim JH, Kim JH, Kim KW, Kim MH, Yu YS. Intravenously administered gold nanoparticles pass through the blood-retinal barrier depending on the particle size, and induce no retinal toxicity. *Nanotechnology.* 2009; 20:505101.

Kim JH, Kim MH, Jo DH, Yu YS, Lee TG, Kim JH. [The inhibition of retinal neovascularization by gold nanoparticles via suppression of VEGFR-2 activation.](#) *Biomaterials.* 2011; 32:1865-1871.

Kirsch R, Woodburne VE, Shephard EG, Kirsch RE. Patients with stable uncomplicated cirrhosis have normal neutrophil function. *J Gastroenterol Hepatol.* 2000; 15: 1298-1306.

Klebanoff S, Clark RA. *The neutrophil: function and clinical disorders.* Amsterdam: Elsevier-North Holland. 1978; 238-408.

Klebanoff S, Clark RA, Rosen H. Myeloperoxidase-mediated cytotoxicity. In: Schultz J, Ahmad F, eds. *Canc. Enzymol.* New York: Academic Press. 1976; 276-288.

Koch AE. Angiogenesis as a target in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2003; 62 (2): 60-67.

Koch AE, Harlow LA, Haines GK, Amento EP, Unemori EN, Wong WL. Vascular endothelial growth factor: a cytokine modulating endothelial function in rheumatoid arthritis. *J Immunol.* 1994; 152: 4149-4156.

Koizumi K, Poulaki V, Doehmen S, Welsandt G, Radetzky S. Contribution of TNF-alpha to leukocyte adhesion, vascular leakage, and apoptotic cell death in endotoxin-induced uveitis in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003; 44(5): 2184-2191.

Kühn SH, Gemperli MB, De Beer FC. Effect of two gold compounds on human polymorphonuclear leukocyte lysosomal function and phagocytosis. *Inflammation.* 1985; 9: 39-44.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227: 680-685.

Larsen A, Kolind K, Pedersen DS, Doering P, Pedersen MO, Danscher G, Penkowa M, Stoltenberg M. Treatment with metallic gold particles reduces neuroninflammation and apoptotic cell death after focal brain injury. *Histochem Cell Biol.* 2008; 130: 681-692.

Lau D, Baldus S. Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease. *Pharmacol Ther.* 2006; 111: 16-26.

- Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 1990; 186: 464-478.
- Levy R, Thanh NT, Doty RC, Hussain I, Nichols RJ, Schiffrin DJ. Rational and combinatorial design of peptide capping ligands for gold nanoparticles. *J Am Chem Soc.* 2004; 126: 10076-10084.
- Li S, Lu H, Hu X, Chen W, Xu Y, Wang J. Expression of TLR4-MyD88 and NF- κ B in the iris during endotoxin-induced uveitis. *Mediators Inflamm.* 2010; 2010:748218
- Love JC, Estroff LA, Kriebel JK, Nuzzo RG, Whitesides GM. Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. *Chem Rev.* 2005; 105: 1103-1169.
- Lu J, Kasama T, Kobayashi K, Yoda Y, Shiozawa F, Hanyuda M, Negishi M, Adachi M. Vascular endothelial growth factor expression and regulation of murine collagen-induced arthritis. *J Immunol.* 2000; 164: 5922-5927.
- Ma JS, Kim WJ, Kim JJ. Gold nanoparticles attenuate LPS-induced NO production through the inhibition of NF- κ B and IFN- β /STAT1 pathways in RAW264.7 cells. *Nitric Oxide.* 2010; 23(3): 214-219.
- Madrigal JL, García-Bueno B, Caso JR, Pérez-Nievas BG, Leza JC. 2006. Stress-induced oxidative changes in brain. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2006; 5: 561-568.
- Mahdihassan S. Cinnabar-gold as the best alchemical drug of longevity, called Makaradhwaaja in India. *Am J Chin Med.* 1985; 13: 93-108.
- Mahdihassan S. Colloidal gold as an alchemical preparation. *Janus.* 1971; 58: 112-118.
- Mahdihassan S. The tradition of alchemy in India. *Am J Chin Med.* 1981; 9: 23-33.
- Matthews SB, Henderson AH, Campbell AK. The adrenochrome pathway: the major route for adrenaline catabolism by polymorphonuclear leucocytes. *J Moll Cell Cardiol.* 1985; 17: 339-348.

Mattson MP, Camandola S. NF-kappaB in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *J Clin Invest.* 2001; 107: 247-254.

Meira DM, Rocha ML, Oréface F. Conceito e classificação das uveítes. In: Oréface F, editor. *Uveíte clínica e cirúrgica.* 2ª ed. Rio de Janeiro: Cultura Médica. 2005; 18-20.

Melamed J, Diligenti F, Krug BC, Amaral KM, consultants. Picon PD, Gadelha MIP, Beltrame A, editors. *Clinical Practice Guidelines for Pharmaceutical Treatment of Noninfectious Posterior Uveitis.* Ministry of Health Department of Health Care Ordinance no. 498 of 23 April 2010.

Melamed j, Guntzel I, Lindenmeyer R. Aspectos epidemiológicos das uveítes no Hospital das Clínicas de Porto Alegre. *Arq Bras Oftal.* 1997; 60: 352-356.

Mémet S. NF-kappaB functions in the nervous system: from development to disease. *Biochem Pharmacol.* 2006; 72: 1180-1195.

Merchant B. Gold, the noble metal and the paradoxes of its toxicology. *Biologicals.* 1998; 26: 49-59.

Milacic V, Chen D, Ronconi L, Landis-Piwowar KR, Fregona D, Dou QP. A novel anticancer gold(III) dithiocarbamate compound inhibits the activity of a purified 20S proteasome and 26S proteasome in human breast cancer cell cultures and xenografts. *Cancer Res.* 2006; 66: 10478-10486.

Milacic V, Fregona D, Dou QP. Gold complexes as prospective metal-based anticancer drugs. *Histol Histopathol.* 2008; 23: 101-108.

Mirkin CA, Letsinger RL, Mucic RC, Storhoff JJ. A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials. *Nature.* 1996; 382: 607-609.

Mirkin CA, Taton TA. Semiconductors meet biology, *Nature.* 2000; 626-627.

Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the auto oxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem.* 1972; 247: 3170-3175.

Mo JS, Matsukawa A, Ohkawara S, Yoshinaga M: Involvement of TNF[alpha], IL-1[beta], and IL-1 receptor antagonist in LPS-induced rabbit uveitis. *Exp Eye Res.* 1988; 66(5): 547-557.

Moberg G, Lindmark G, Moberg L, Venge P. The peroxidase activity and cellular content of granule proteins in PMN during pregnancy. *Br J Haematol.* 1983; 55: 701-708.

Mukherjee P, Bhattacharya R, Wang P, Wang L, Basu S, Nagy JA, Atala A. Antiangiogenic properties of gold nanoparticles. *Clin Cancer Res.* 2005; 11: 3530-3534.

Mulvaney P. Surface plasmon spectroscopy of nanosized metal particles. *Langmuir.* 1996; 12: 788-798.

Nagashima M, Wauke K, Hirano D, Ishigami S, Aono H, Takai M, Sasano M. Effects of combinations of anti-rheumatic drugs on the production of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in cultured synoviocytes and patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology.* 2000; 39: 1255-1262.

Nakamuta M, Ohashi M, Tanabe Y, Hiroshige K, Nawata H. High plasma concentration of myeloperoxidase in cirrhosis: a possible marker of hypersplenism. *Hepatology.* 1993; 18: 1377-1383.

Nam KN, Koketsu M, Lee EH. 5-Chloroacetyl-2-amino- 1,3-selenazoles attenuate microglial inflammatory responses through NF-kappaB inhibition. *Eur J Pharmacol.* 2008; 589: 53-57.

Nascimento VP, Takei LM, Takahashi WY, Kara-José N. Epidemiologia dos atendimentos de seis meses do pronto socorro oftalmológico do HCFMUSP [resumo]. [Apresentado no 300 Congresso Brasileiro de Oftalmologia; 1999; Recife].

Navarro M, Fraile G, Velásquez M, González E, Escalona J, Ilanjan R, Abad MJ, Taylor P. Effect of a gold-chloroquine complex on

inflammation-related leukocyte functions and cell viability. Comparison with auranofin. *Arzneimittelforschung*. 2006; 56: 826-833.

Nie S, Xing Y, Kim GJ, Simons JW. Nanotechnology applications in cancer. *Annu Rev Biomed Eng*. 2007; 9: 257-288.

Noda K, Miyahara S, Nakazawa T. Inhibition of vascular adhesion protein-1 suppresses endotoxin-induced uveitis. *FASEB J*. 2008; 22: 1094-1103.

Nussbaum RL, McInes RR, Willard HF. *Thompson & Thompson genetics in medicine*. 6th ed. Philadelphia: Saunders. 2001; 1-444

Oréfice F. *Uveíte clínica e cirúrgica: texto e atlas*. 2º ed. Rio de Janeiro: Cultura Médica. 2005; 1: 15-21,45-59.

Paleolog EM. Angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res*. 2002; 4 (3): 81-90.

Päivönsalo TH, Tuominen J, Vaahtoranta HL, Saari KM. Incidence and prevalence of different uveitis entities in Finland. *Acta Ophthalmol Scand*. 1997; 75 (1): 76-81.

Pereira DV, Steckert AV, Mina F, Petronilho F, Roesler R, Schwartzmann G, Ritter C, Dal-Pizzol F. Effects of an Antagonist of the Gastrin- Releasing Peptide Receptor in an Animal Model of Uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009; 50(11): 5300-5303.

Pérez-Guijo V, Santos-Lacombe M, Sanchez-Hernandez M. Tumor necrosis factor alpha levels in aqueous humor and serum from patients with uveitis: the involvement of HLAB27. *Curr Med Res Opin*. 2004; 20: 155-157.

Perkins ND. "Integrating cell-signalling pathways with NF- κ B and IKK function". *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007; 8 (1): 49-62.

Pillarsetty N, Katti KK, Hoffman TJ, Volkert WA, Katti KV, Kamei H, Koide T. In vitro and in vivo antitumor properties of tetrakis((trishydroxy-methyl)phosphine)gold(I) chloride. *J Med Chem*. 2003; 46: 1130-1132.

Pincus T, Ferraccioli G, Sokka T, Larsen A, Rau R, Kushner I, Wolfe F. Evidence from clinical trials and long-term observational studies that disease-modifying anti-rheumatic drugs slow radiographic progression in rheumatoid arthritis: updating a 1983 review. *Rheumatology*. 2002; 41: 1346-1356.

Pivetti PP, Accorinti M, La Cava M, Colabelli RAG, Abdulaziz M. Endogenous uveitis: analysis of 1417 cases. *Ophthalmologica*. 1996; 210(4): 234-238.

Porter LA, Ji D, Westcott SL, Graupe M, Czernuszewicz RS, Halas NJ, Lee TR. Gold and silver nanoparticles functionalized by the adsorption of dialkyl disulfides. *Langmuir*. 1998; 14:7378-7386.

Powis G. Hepatic microsomal metabolism of epinephrine and adrenochrome by superoxide-dependent and -independent pathways. *Biochem Pharmacol*. 1979; 28: 83-89.

Ribeiro FAQ, Pereira CSB. Otite média crônica colesteatomatosa em: *Tratado de otorrinolaringologia*. 1ª ed. São Paulo: Editora Roca. 2003; 93-102.

Rigobello MP, Messori L, Marcon G, Agostina MC, Bragadin M, Folda A, Scutari G, Bindoli A. Gold complexes inhibit mitochondrial thioredoxin reductase: consequences on mitochondrial functions. *J Inorg Biochem*. 2004a; 98: 1634-1641.

Rigobello MP, Scutari G, Folda A, Bindoli A. Mitochondrial thioredoxin reductase inhibition by gold(I) compounds and concurrent stimulation of permeability transition and release of cytochrome c. *Biochem Pharmacol*. 2004b; 67: 689-696.

Rocksén D, Lillehook B, Larsson R, Johansson T, Bucht A. Differential anti-inflammatory and anti-oxidative effects of dexamethasone and N-acetylcysteine in endotoxin-induced lung inflammation. *Clin Exp Immunol*. 2000; 122: 249-256.

Rodriguez A, Calonge M, Pedroza MS, Akova YA, Messmer EM, Damico DJ, Foster CS. Referral patterns in a tertiary eye care center. *Arch Ophthalmol*. 1996; 114 (15): 593-599.

Rosenbaum JT, Rosenzweig HL, Smith JR, Martin TM, Planck SR. Uveitis secondary to bacterial products. *Ophthalmic Res.* 2008; 40: 165-168.

Salvemini D; Mazzon E; Dugo L; Riley DP; Serriano L; Caputi AP; et al. Pharmacological manipulation of the inflammatory cascade by the superoxide dismutase mimetic, M40403. *Br J Pharmacol.* 2001; 132: 815-827.

Santos-Lacomba M, Marcos-Martin C, Gallardo-Galera JM. Aqueous humor and serum tumor necrosis factor-alpha in clinical uveitis. *Ophthalmic Res.* 2001; 33: 251-255.

Selvakannan PR, Mandal S, Phadtare S, Pasricha R, Sastry M. Capping of gold nanoparticles by the amino acid lysine renders them water-dispersible. *Langmuir.* 2003; 19: 3545-3549.

Sen R, Baltimore D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell.* 1986; 46: 705-716.

Shah ZA, Gilani RA, Sharma P, Vohora SB. Shashi Bharat Basic. *Clin Pharmacol Toxicol.* 2005; 96: 469.

Shah ZA, Vohora SB. Antioxidant/restorative effects of calcined gold preparations used in Indian systems of medicine against global and focal models of ischaemia. *Pharmacol Toxicol.* 2002; 90 (5): 254-259.

Sharma A, Tandon A, Tovey JC, Gupta R, Robertson JD, Fortune JA, Klibanov AM, Cowden JW, Rieger FG, Mohan RR. Polyethylenimineconjugated gold nanoparticles: Gene transfer potential and low toxicity in the cornea. *Nanomedicine.* 2011; 7:505-513.

Shaw III CF. *Chem Rev.* 1999; 99: 2589.

Shaw IC. Gold-based therapeutic agents, *Chem Rev.* 1999; 99: 2589-2600.

Shukla R, Bansal V, Chaudhary M, Basu A, Bhonde RR, Sastry M. Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: a microscopic overview. *Langmuir.* 2005; 21: 10644-10654.

- Silva CG. O que é nanotecnologia. 2002; 10:1. Available from: URL: <http://www.comciencia.br/reportagens/nanotecnologia/nano10.htm>
- Sokolov K, Follen M, Aaron J, Pavlova I, Malpica A, Lotan R. Real-time vital optical imaging of precancer using antiepidermal growth factor receptor antibodies conjugated to gold nanoparticles. *Cancer Res.* 2003; 63: 1999-2004.
- Spinelli HM, Krohn DL. Inhibition of induced iritis. *Arch Ophthalmol.* 1980; 98: 1106-1109.
- Szekanecz Z, Gaspar L, Koch AE. Angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Front Biosci.* 2005; 10:1739-1753.
- Takase H, Futagami Y, Yoshida T, Kamoi K, Sugita S, Imai Y, Mochizuki M. Cytokine profile in aqueous humor and sera of patients with infectious or noninfectious uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006; 47 (4): 1557-1561.
- Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol.* 2005, 17: 1-14.
- Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol.* 2003; 1: 335-376.
- Toderas F, Iosin M, Astilean S. Luminescence properties of gold nanorods. *Nucl Instrum Methods Phys Res. B* 2009; 267: 400-402.
- Tran VT, Auer C, Guex-Crosier Y, Pittet N, Herbort CP. Epidemiological characteristics of uveitis in Switzerland. *Int Ophthalmol.* 1994; 18 (5): 293-298.
- Tsai CY, Shiau AL, Chen SY, Chen YH, Cheng PC, Chang MY, Chen DH, Chou CH, Wang CR, Wu CL. Amelioration of collagen-induced arthritis in rats by nanogold. *Arthritis Rheum.* 2007; 56 (2): 544-554.
- Tsai CY, Shiau AL, Cheng PC, Shieh DB, Chen DH, Chou CH, Yeh CS. A biological strategy for fabrication of Au/EGFP nanoparticle conjugates retaining bioactivity. *Nano Lett.* 2004; 4: 1209-1212.

Turkevich J, Stevenson PC, Hillier J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discuss Faraday Soc.* 1951; 11: 55-75.

Vaughan D, Asbury T, Riordan-Eva P. *Oftalmologia geral*. 15ª ed. (Atheneu ed.). São Paulo. 2003; 142.

Wakefield D, Chang JH. Epidemiology of uveitis. *Int Ophthalmol Clin.* 2005; 45(2): 1-13.

Wang J, Lu H, Hum X. Nuclear factor translocation and acute anterior uveitis. *Mol Vis.* 2011; 17: 170-176.

Wang J, Lu H, Xu Y, Hu X, Chen W, Li S. The effect of toll-like receptor 4 in the aqueous humor of endotoxin-induced uveitis. *Int J Mol Sci.* 2012; 13: 2110-2118.

Wang MD, Shin DM, Simons JW, Nie S. Nanotechnology for targeted cancer therapy, *Expert Rev Anticancer Ther.* 2007; 7: 833-837.

Wataha JC, Lewis JB, Volkmann KR, Lockwood PE, Messer RL, Bouillaguet S. Sublethal concentrations of Au (III), Pd (II), and Ni(II) differentially alter inflammatory cytokine secretion from activated monocytes. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2004; 69: 11-17.

Xu Y, Chen W, Lu H. The expression of cytokines in the aqueous humor and serum during endotoxin-induced uveitis in C3H/HeN mice. *Mol Vis.* 2010; 16: 1689- 1695.

Yagi K. Simple assay for the level of total lipid peroxides in serum or plasma. *Methods Mol Biol.* 1988; 108: 101-106.

Yamashita M, Ashino S, Oshima Y, Kawamura S, Ohuchi K, Takayanagi M. Inhibition of TPA-induced NF-kappaB nuclear translocation and production of NO and PGE2 by the anti-rheumatic gold compounds. *J Pharm Pharmacol.* 2003; 55: 245-251.

Yang JP, Merin JP, Nakano T, Kato T, Kitade Y, Okamoto T. Inhibition of the DNA-binding activity of NF-kappa B by gold compounds in vitro. *FEBS Lett.* 1995; 361: 89-96.

Yoshida SI, Kato T, Sakurada S, Kurono C, Yang JP, Matsui N, Soji T, Okamoto T. Inhibition of IL-6 and IL-8 induction from cultured rheumatoid synovial fibroblasts by treatment with aurothioglucose. *Int Immunol.* 1999; 11: 151-158.

You CCM, Gider OR, Ghosh B, Kim SP, Erdogan I, Krovi B, Bunz SA, Rotello UHF. Detection and identification of proteins using nanoparticle? Fluorescent polymer 'chemical nose' sensors. *Nat Nanotechnol.* 2007; 2: 318-323.

Zhang CX, Lippard SJ. New metal complexes as potential therapeutics. *Curr Opin Chem Biol.* 2003; 7: 481-489.

Zhang Z, Zhong W, Hall MJ, Kurre P, Spencer D, Skinner A, O'Neill S, Xia Z, Rosenbaum JT. CXCR4 but not CXCR7 is mainly implicated in ocular leukocyte trafficking during ovalbumin-induced acute uveitis. *Exp Eye Res.* 2009; 89: 522-531.

Zhao H, Ning Y. Chinas's ancient gold drugs. *Gold Bull.* 2001; 34: 24-29.

Zivot J B, Hoffman W D. Pathogenic effects of endotoxin. *New Horiz.* 1995; 3: 267-275.