

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA
MOLECULAR

**Efeitos citotóxicos e genotóxicos de uma nova nanopartícula de
titânio de interesse industrial - *in vitro***

SÃO CARLOS

2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA
MOLECULAR

**Efeitos citotóxicos e genotóxicos de uma nova nanopartícula de
titânio de interesse industrial - *in vitro***

Matheus Pedrino Gonçalves

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos como parte do requisito para obtenção do Título de Mestre em Genética Evolutiva e Biologia Molecular.

Orientação: Prof.^a Dra. Fernanda de Freitas Anibal – UFSCar

Coorientação: Prof.^a Dra. Karina Nogueira Zambone Pinto Rossi – UFSCar

SÃO CARLOS

2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Matheus Pedrino Gonçalves, realizada em 15/02/2020:

Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal
UFSCar

Prof. Dr. Ricardo Carneiro Borra
UFSCar

Profa. Dra. Ilana Lopes Barafella da Cunha Camargo
USP

**Dedico esse trabalho à
minha família, em especial aos meus avós Sirley
Santezi Pedrino e José Pedrino (*in memoriam*)
que sempre me inspiraram na vida acadêmica**

Agradecimentos

Agradeço à toda minha família, Valéria A. P. Gonçalves, Sérgio Gonçalves e Marcos P. Gonçalves por todo o apoio que tive ao longo dessa jornada.

Agradeço à minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Fernanda de Freitas Anibal pelo apoio no desenvolvimento desse trabalho e na amizade que concretizamos ao longo desses anos.

Agradeço à minha coorientadora Prof.^a Dr.^a Karina Zamboni Pinto Rossi pela participação e oferecimento de seu laboratório para o desenvolvimento desse trabalho.

Agradeço ao Prof. Marcos Roberto Chiaratti pelo empréstimo de equipamentos para a realização do Ensaio Cometa.

Agradeço ao Prof. Dr. Valtencir Zucolotto e sua equipe de trabalho por toda a ajuda na caracterização físico-química da nanopartícula e também ao disponibilizar o uso de seus equipamentos.

Agradeço ao Prof. Dr. Koiti Araki e seu grupo de pesquisa pela síntese da nanopartícula de titânio e envio de amostras para os testes de citotoxicidade e genotoxicidade *in vitro*.

Agradeço à Prof.^a Dr.^a Marisa Narciso Fernandes por conceder o uso do microscópio de fluorescência de seu laboratório para análises do Ensaio Cometa e pelo apoio do técnico Gustavo e seus pesquisadores.

Agradeço à empresa Petrobras pela bolsa de estudos concedida.

À Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por toda a infraestrutura oferecida para que o trabalho fosse realizado.

A todos os meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

Nanopartículas de titânio (NPs TiO₂) estão listadas como um dos nanomateriais mais utilizados pelas indústrias em geral sendo empregadas em revestimentos, pigmentos e tintas pela sua capacidade em oferecer opacidade e brilho, em bloqueadores solares por filtrar os raios ultravioleta (UV) e na confecção de células fotovoltaicas. Além disso, nanopartículas são altamente utilizadas pela indústria petroquímica na extração melhorada de petróleo. Esse cenário culminou no crescimento do uso de nanopartículas e na preocupação acerca de seus efeitos nocivos ao meio ambiente e os seres vivos. Assim, tornou-se importante avaliar os efeitos tóxicos de nanomateriais após exposição à modelos biológicos (células e tecidos) para a compreensão de seus riscos a quem os produzissem e os manipularia. Dessa forma, o presente trabalho buscou avaliar a citotoxicidade e genotoxicidade de uma nova NP TiO₂ de interesse da indústria petroquímica e sua resposta imune frente à modelos *in vitro*. O ensaio de citotoxicidade com MTT foi utilizado para avaliar a viabilidade celular de fibroblastos LA-9 após exposição à NP TiO₂ (2000, 1000, 100, 10 e 0,1 µg/mL) nos períodos de 24, 48, 72 e 96 h e de macrófagos J774A.1 nos períodos de 24, 48 e 72 h. O Ensaio Cometa (em pH alcalino) foi utilizado para avaliar a genotoxicidade da NP TiO₂ (100, 10 e 1 µg/mL) sobre os fibroblastos após o período de exposição de 24 h. Foi realizada a dosagem das citocinas IL-10, TNF-α e IL-12 no sobrenadante celular de macrófagos após exposição à NP TiO₂ (1000, 100 e 10 µg/mL) nos períodos de 24, 48 e 72 h via ELISA e avaliada a expressão dos genes *iNOS*, *Stat6* e *NF-kB* via qRT-PCR. Em fibroblastos a NP TiO₂ promoveu efeitos citotóxicos apenas no período de 96 h de exposição nas concentrações de 2000 e 1000 µg/mL e foi genotóxica em todas as concentrações testadas no período de 24 h em relação ao controle negativo. Em macrófagos houve redução de viabilidade celular a partir do período de 48 h de exposição nas concentrações de 2000 e 1000 µg/mL. A dosagem de citocinas e análise de expressão gênica em macrófagos sugerem que a internalização da NP TiO₂ em altas concentrações (≥ 1000 µg/mL) no período de 72 h pode ter gerado um processo de ativação intracelular, refletido nos altos níveis de produção de IL-12, e que possivelmente induziu para a produção de IL-10 como um fator regulatório, além de ser concordante com o aumento da expressão dos genes *Stat6* e *NF-kB* que participam da polarização celular em macrófagos. A expressão gênica elevada de *iNOS* após exposição à NP TiO₂ (1000 µg/mL) representa um dos componentes da resposta inflamatória nessa condição experimental. O principal mecanismo de toxicidade sugerido é o potencial fotocatalítico da NP TiO₂ devido a sua composição mineral (anatase) e a possível geração de espécies reativas de oxigênio. Assim, a NP TiO₂ foi citotóxica em altas concentrações (≥ 1000 µg/mL) em ambas as linhagens celulares avaliadas e genotóxica no período de 24 h para a linhagem de fibroblastos.

Palavras-chave: nanopartículas de titânio, citotoxicidade, genotoxicidade, inflamação.

ABSTRACT

Titanium dioxide nanoparticles (TiO₂ NP) are included as one of the most used nanomaterials by industries in general; it is applied in coatings, pigments, and paints for its ability to offer opacity and brightness, in sunscreens blocking ultraviolet rays (UV) and in the manufacture of photovoltaic cells. In addition, nanoparticles are highly used by the petrochemical industry to improve oil extraction. This scenario culminated in the growing use of nanoparticles and in the concern about their harmful effects on the environment and living beings. Thus, it became important to assess the toxic effects of nanomaterials after exposure to biological models (cells and tissues) to understand their risks to those who produce and manipulate them. Our work aimed to evaluate the cytotoxicity and genotoxicity of a new TiO₂ NP and its immune response to *in vitro* models. The MTT cytotoxicity assay was used to assess the cell viability following exposure to TiO₂ NP (2000, 1000, 100, 10 and 0.1 µg / mL) at 24, 48, 72 and 96 h in mouse fibroblasts LA-9 and at 24, 48 and 72 h in macrophages J774A.1. The comet assay (pH alkaline) was used to evaluate the genotoxicity of TiO₂ NP (100, 10 and 1 µg / mL) after exposure to fibroblasts during 24 h. Cytokines IL-10, TNF-α, and IL-12 were measured in macrophage cell supernatant after exposure to TiO₂ NP (1000, 100 and 10 µg / mL) at 24, 48 and 72 h by ELISA, and evaluated the expression of genes *Nos2*, *Stat6* and *Nfkb* by qRT-PCR. In fibroblasts, TiO₂ NP promoted cytotoxic effects at 96 h in the concentrations of 2000 and 1000 µg / mL and was genotoxic in all concentrations tested at 24 h compared to negative control. In macrophages, there was a decrease in cell viability after 48 h of exposure at concentrations of 2000 and 1000 µg/mL. Cytokine dosage and gene expression analysis in macrophages suggest that TiO₂ NP uptake in high concentrations (≥ 1000 µg / mL) at 72 h may have generated an intracellular activation process, reflected in the high levels of IL-12, which possibly induced the production of IL-10 as a regulatory factor, in addition to being in agreement with the increased expression of the *Stat6* and *NF-kB* genes that participate in cellular polarization in these cells. The high *Nos2* expression after exposure to TiO₂ NP (1000 µg / mL) demonstrates the activation of the inflammatory process in this experimental condition. The main toxicity mechanism suggested is the photocatalytic potential of TiO₂ NP due to its mineral composition (anatase) and the possible generation of reactive oxygen species. Thus, TiO₂ NP was cytotoxic to both cell lines in high concentrations and genotoxic to fibroblast at 24 h.

Keywords: titanium dioxide nanoparticles, cytotoxicity, genotoxicity, inflammation.

LISTA DE ABREVIACÕES

µg: micrograma	iNOS: óxido nítrico sintase induzível
µL: microlitro (s)	M: molar
µM: micromolar	MET: microscopia eletrônica de transmissão
B2M: 2-β-microtubulina	min: minuto (s)
BLAST: <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>	mM: milimolar
cDNA: DNA complementar	MMS: metanossulfonato de metila
DEPC: pirocarbonato de dietila	MTT: brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio
DMEM: <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>	NF-kB: fator nuclear Kappa B
DMSO: dimetilsulfóxido	°C: grau Celsius
DNA: ácido desoxirribonucleico	pb: pares de base
dNTP: desoxirribonucleotídeos fostatados	PBS: fosfato-salino
EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético	RNA: ácido ribonucleico
ELISA: <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>	RPMI: <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
EPM: erro padrão da média	s: segundo (s)
EROs: espécies reativas de oxigênio	<i>Stat6: Signal Transducers and Activators of Transcription 6</i>
h: hora (s)	TMB: tetrametilbenzidina
<i>Hmbs</i> : hidroximetilbilano sintase	TNF-α: fator de necrose tumoral alfa
IL-10: Interleucina 10	nm: nanômetros
IL-12: Interleucina 12	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Os tipos de nanopartículas e sua relação com a dimensão das escalas macro e microscópica.....	15
Figura 2. Processo secundário de extração de petróleo com uso associado de nanopartícula.	17
Figura 3. Estruturas cristalinas do dióxido de titânio..	18
Figura 4. Acúmulo intracelular de NP TiO ₂ após exposição de 4h em concentração de 50 µg/mL em células A549 visualizado por MEV.....	22
Figura 5. Organograma experimental dos principais tópicos metodológicos.	26
Figura 6. Resumo do ensaio de citotoxicidade para a NP TiO ₂ em fibroblastos LA-9 e macrófagos J774A.1.....	30
Figura 7. Avaliação visual para nomenclatura de classificação dos cometas em classe.	34
Figura 8. Porcentagem da viabilidade celular de fibroblastos LA-9, utilizando a concentração celular de 3x10 ⁴ células/mL após os períodos de exposição de 24 (A), 48 (B), 72 (C) e 96 h (D) à NP TiO ₂	46
Figura 9. Porcentagem da viabilidade celular de macrófagos J774A.1, utilizando a concentração celular de 5x10 ⁴ células/mL após os períodos de exposição de 24 (A), 48 (B) e 72 h (C) à NP TiO ₂	48
Figura 10. Escore de dano ao DNA induzido após a exposição de fibroblastos LA-9 à NP TiO ₂ durante o período de 24 h.....	55
Figura 11. Perfil de produção de citocinas (IL-10 e TNF-α) em µg/mL após exposição de macrófagos J774A.1 à NP TiO ₂ nos períodos de 24, 48 e 72 h.....	59
Figura 12. Perfil de produção da citocina IL-12 em µg/mL após exposição de macrófagos J774A.1 à NP TiO ₂ nos períodos de 24, 48 e 72 h.	60
Figura 13. Avaliação da expressão gênica via qRT-PCR dos genes <i>Nos2</i> (A), <i>Stat6</i> (B) e <i>Nfkb</i> (C) em relação ao grupo calibrador (controle negativo)..	64
Figura 14. Resumo dos efeitos citotóxicos e genotóxicos em fibroblastos (LA-9) após exposição à NP TiO ₂	69
Figura 15. Resumo da modulação da resposta inflamatória em macrófagos (J774A.1) após exposição à NP TiO ₂	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resumo das características primárias da NP TiO ₂	27
Tabela 2. Informações sobre os pares de <i>primers</i> desenhados para avaliação da expressão gênica em macrófagos após exposição à NP TiO ₂ via qRT-PCR.	36
Tabela 3. Resumo das características físico-químicas da NP TiO ₂	42
Tabela 4. Resultados da análise de viabilidade celular em fibroblastos LA-9, após processamento das células para realização do Ensaio Cometa.....	53
Tabela 5. Resultados de escore de dano ao DNA obtidos por meio de Ensaio Cometa após exposição de fibroblastos LA-9 à NP TiO ₂ durante o período de 24 h.	55
Tabela 6. Quantificação dos RNAs de macrófagos J774A.1 antes do tratamento com DNase e índices de integridade (A260/A280) e contaminação (A260/A230).	62
Tabela 7. Cálculo e parâmetros de Eficiência obtidos para cada par de <i>primers</i>	63

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 Nanotecnologia e suas aplicações gerais.....	12
1.2 Nanopartículas e a Indústria Petroquímica.....	15
1.3 Nanopartículas de titânio	18
1.4 A toxicidade de NPsTiO ₂	19
2. OBJETIVOS	25
2.1 Objetivos gerais	25
2.2 Objetivos específicos	25
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1 Nanopartícula de titânio.....	26
3.2 Caracterização da nova NP TiO ₂	27
3.3 Linhagens celulares	27
3.4 Cultivo de fibroblastos LA-9 e macrófagos J774A.1	28
3.5 Ensaio de citotoxicidade (MTT).....	29
3.6 Quantificação de IL-10, TNF- α e IL-12 via ensaio imunoenzimático (ELISA)	31
3.7 Ensaio de genotoxicidade (Cometa)	32
3.8 Avaliação da expressão dos genes <i>Nos2</i> , <i>Stat6</i> e <i>Nfkb</i> em macrófagos via qRT-PCR.	35
3.8.1 Seleção dos alvos moleculares e desenho de <i>primers</i>	35
3.8.2 Extração de RNA	36
3.8.3 Síntese de cDNA.....	38
3.8.4 Cálculo da eficiência dos <i>primers</i>	38
3.9 Análise estatística	40
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1 Caracterização da NP TiO ₂	41
4.2 Ensaio de citotoxicidade (MTT) em fibroblastos e macrófagos.....	45
4.3 Ensaio de Genotoxicidade (Cometa) em fibroblastos LA-9.....	53
4.4 Quantificação de IL-10, TNF- α e IL-12 por ensaio imunoenzimático (ELISA) em macrófagos J774A.1.....	58
4.5 Análise da expressão gênica em macrófagos J774A.1	62
4.5.1 Extração de RNA	62
4.5.2 Avaliação da expressão dos genes <i>Nos2</i> , <i>Stat6</i> e <i>Nfkb</i> em macrófagos.	63
5. CONCLUSÃO	69
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

1. INTRODUÇÃO

1.1 Nanotecnologia e suas aplicações gerais

Desde o início do século XXI até os dias atuais, a nanotecnologia tem revolucionado a indústria mundial, com a criação de materiais inovadores e aplicados à diversas áreas (médica, agrícola, construção civil) e até utilizados em nosso cotidiano. De acordo com a fala de Richard Feynman, pai da nanotecnologia, a partir do *design* e arranjo preciso de átomos e moléculas, é possível criar estruturas com propriedades físico-químicas únicas, conhecidas como nanomateriais (FRANKE, 2005). Devido a boa condutibilidade térmica e elétrica, resistência e durabilidade frente à fatores externos, além da redução de seu custo de produção, os nanomateriais são empregados nas mais diversas áreas tecnológicas, com características que podem ser moldadas durante sua fase de produção (SERRANO; RUS; GARCÍA-MARTÍNEZ, 2009). Assim, a nanotecnologia como área do conhecimento, fornece o conjunto de ferramentas para construção e síntese desses novos nanomateriais.

Com a nanotecnologia é possível construir nanomateriais com maior eficiência e custo-benefício, além de fornecer a possibilidade de controle de suas propriedades, o que é associado principalmente à razão volume/área superficial. Em relação à síntese de nanomateriais, estes podem ser produzidos via dois métodos, *top-down* e/ou *bottom-up* (MITTAL; CHISTI; BANERJEE, 2013) que empregam compostos químicos e condições de temperatura e pressão adequadas ao rearranjo e formação das estruturas em nano escala. O método *top-down* é realizado por meio de tratamentos químicos e/ou físicos, como a moagem e gravura mecânica, nos quais um determinado tipo de material tem seu tamanho reduzido em nano escala. Enquanto isso, o método *bottom-up* faz uso de átomos e moléculas (*building blocks*) que são acoplados e manipulados para a construção das nanopartículas. O uso da condensação molecular/atômica e os métodos de precipitação química/eletroquímica são exemplos de metodologias de *bottom-up* (MITTAL; CHISTI; BANERJEE, 2013). Ao final da síntese, é possível realizar a caracterização físico-química do nanomaterial e determinar seu tamanho, formato, composição, dentre outros parâmetros. Porém, a definição de “o que é um nanomaterial” e a forma como devem ser aplicados e utilizados, gerou discussões entre a comunidade científica e corporações internacionais (BLEEKER et al., 2013; TINKLE et al., 2014).

Dentre as definições disponíveis, os nanomateriais são caracterizados por apresentar no mínimo uma de suas dimensões variando entre 1 e 100 nanômetros (nm) segundo a *U.S National Nanotechnology Initiative*. Já o *European Medicines Agency* define os nanomateriais como sistemas desenhados e destinados para aplicações clínicas, com características e propriedades reprodutíveis para uso médico (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2014). O *Food and Drug Administration* (FDA) também possui outra definição, mais simples e direcionada às áreas da engenharia, aonde adota que um nanomaterial deve apresentar dimensões que variam de 1 a 100 nm (*Guidance for Industry*, FDA, 2014). Na tentativa de encontrar a definição mais adequada para nanomateriais, Comissões e órgãos científicos europeus definiram parâmetros para sua identificação. Assim, nanomaterial pode ser definido como uma partícula incidental, natural ou manufaturada, que pode apresentar-se em estado de não interação ou aglomerado com ao menos uma de suas dimensões de tamanho entre 1 e 100 nm em função de sua curva de distribuição (POTOČNIK, 2011). Essa mesma definição já foi remodelada por órgãos de liberação de uso de nanomateriais em função de suas aplicações e fins, como foram os casos de destino para a nano medicina (SOARES et al., 2018). Porém, o destaque da definição europeia é a atribuição de três aspectos fundamentais que um nanomaterial deve apresentar: tamanho, distribuição e área superficial (POTOČNIK, 2011; BLEEKER et al., 2013; BOVERHOF et al., 2015).

O tamanho é considerado como a principal característica que interfere nas propriedades físico-químicas e biológicas de nanomateriais, o que não exclui que outras características possam influenciar em seu comportamento. Em relação ao tamanho, os nanomateriais podem se apresentar na forma de partículas primárias, agregados e aglomerados. Uma partícula primária é definida como matéria (átomos/moléculas) que possui ligações físicas bem definidas (OBERDÖRSTER, 2010; POTOČNIK, 2011). Já os agregados e aglomerados correspondem à forma de interação entre essas partículas primárias, que podem ocorrer por meio de ligações fortes, caracterizando um agregado, ou por ligações fracas, como é o caso dos aglomerados (OBERDÖRSTER, 2010; POTOČNIK, 2011). A variação da superfície de contato e interação entre essas três diferentes formas de partículas é um importante fator para a heterogeneidade de aplicações desejáveis e efeitos que as nanopartículas podem apresentar.

O segundo aspecto fundamental de nanomateriais é o padrão de distribuição em tamanho, que representa as variações em tamanho que um nanomaterial poderá apresentar quando em dispersão. É comum que nanomateriais sejam encontrados na forma polidispersa quando compostos por partículas de tamanhos diferentes ou monodispersa quando possuem partículas de igual tamanho (POTOČNIK, 2011; BLEEKER et al., 2013; BOVERHOF et al., 2015). O terceiro aspecto é a área superficial, considerado principalmente para questões legislativas, e que determina um limite de área superficial maior que $60 \text{ m}^2/\text{cm}^3$ como característica de um nanomaterial. Claramente, todas essas características foram definidas pela Comissão Europeia, que possui até o momento, uma das melhores regulamentações no mundo relacionada à nanotecnologia. Conseqüentemente com o melhor entendimento e definição do que são os nanomateriais observa-se a tendência de crescimento em sua comercialização.

Dentre os diferentes tipos de nanopartículas utilizadas pelas indústrias (Figura 1), destacam-se as metálicas (ouro e prata), as de óxido metálico (alumínio e titânio) e não-metálico (sílica), os nanotubos de carbono e as partículas magnéticas. Outros nanomateriais engenheirados podem apresentar estruturas uni, bi ou tridimensionais exemplificadas respectivamente pelas nano folhas, nano tubos e os dendrímeros (ARFIN; TARANNUM, 2018). Os nanomateriais possuem um conjunto diverso de aplicações industriais, com destaque para a indústria petroquímica, em processos de perfuração, cimentação e recuperação melhorada do petróleo (YU et al., 2014; KHALIL et al., 2017), na indústria alimentícia ao conferir propriedades desejáveis aos alimentos como pigmentação, proteção contra reagentes químicos e melhoria em absorção (HE; HWANG, 2016) e na indústria civil na produção de materiais com maior durabilidade, melhoria em força mecânica e menor custo (AZAM; AKHTAR, 2017). Na biomedicina e biotecnologia, os nanomateriais são aplicados na área da saúde para o monitoramento e diagnóstico de doenças (CABUZU et al., 2015), na terapia do câncer (HIRSCH et al., 2003), em imobilização enzimática (QHOBOSHEANE et al., 2001) e como veículos de transporte e entrega de fármacos (VENKATESAN et al., 2005), com destaque para nanocarreadores como lipossomas, nanopartículas lipídicas e de ferro (SUN et al., 2016; MAEKI et al., 2018). Principalmente para a área biológica, os nanomateriais apresentam interações diferentes aos sistemas biológicos em comparação às “drogas de baixo peso molecular” devido a sua reatividade atômica. Um dos aspectos já citados que está diretamente relacionado com a reatividade é o tamanho, sendo que quanto menor uma nanopartícula, maior será o número de átomos em sua superfície, conseqüentemente aumentando sua reatividade (AUFFAN et al., 2009).

Visto as inúmeras aplicações, nanomateriais tornaram-se de grande interesse para empresas como é o exemplo da empresa nacional “Petróleo Brasileiro S.A” (PETROBRAS) que busca a aplicação de nanopartículas na melhoria da extração de petróleo. Com o interesse em aplicá-las futuramente, a empresa tem trabalhado no desenvolvimento de novos nanomateriais e na avaliação de seus possíveis efeitos tóxicos. Dessa forma, será apresentada a seguir a relação das nanopartículas com a indústria petrolífera e o desenvolvimento da nanotoxicologia.

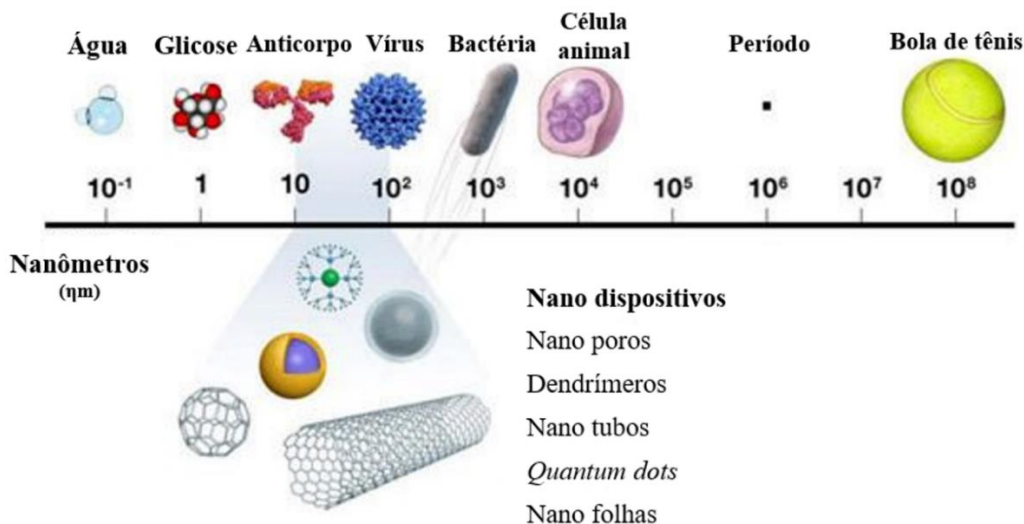


Figura 1. Os tipos de nanopartículas e sua relação com a dimensão das escalas macro e microscópica. (Adaptado de *Introduction to Nanotechnology – Size of the Nanoscale*).

1.2 Nanopartículas e a Indústria Petroquímica

A matriz energética mundial ainda é muito dependente de fontes de energia não-renováveis, baseadas na exploração de reservatórios de hidrocarbonetos, como o petróleo. Com o aumento da demanda por energia, a indústria petroquímica tem buscado alternativas que melhorem a eficiência na retirada do petróleo dos poços de extração e que tornem esse processo economicamente e ambientalmente viável. Os principais obstáculos enfrentados pela indústria petroquímica estão relacionados com a fase inicial de exploração, que corresponde ao mapeamento e manejo de reservatórios, aos processos de perfuração da rocha, até o refinamento e processamento do petróleo (KONG; OHADI, 2010). Assim, o surgimento da nanotecnologia foi visto como uma alternativa para melhorar a extração e produção de petróleo, uma vez que permite que os problemas enfrentados por engenheiros possam ser solucionados com a aplicação de nanopartículas.

Os nanomateriais podem ser aplicados de forma contínua durante o processo de extração de petróleo, desde o início da exploração, onde não se conhecem as características geológicas do poço, até a etapa de melhorar a recuperação e armazenamento (KHALIL et al., 2017). É possível explorar um reservatório do ponto de vista geoquímico a partir do uso de nanopartículas, na obtenção de informações sobre a deposição de minérios (WANG et al., 1997). Nanomateriais podem ser empregados para melhorar o aproveitamento de petróleo durante sua extração, representado pelo uso das nanopartículas de sílica (NP SiO₂) que reduzem a formação de espuma, um subproduto indesejável durante o processo (YU et al., 2014). Destaca-se o uso das nanopartículas de óxidos metálicos, como é o caso do titânio, que podem ser utilizadas como um aditivo em fluídos para a perfuração de poços de petróleo (MAO et al., 2015) e também melhorar o seu processo de recuperação (HENDRANINGRAT; TORSÆTER, 2015). Em equipamentos de perfuração, a aplicação de revestimentos à base de nanopartículas aumentam a resistência a água e corrosão e melhoram a durabilidade e resistência (KONG; OHADI, 2010), fatores estes economicamente favoráveis para a indústria.

Em aplicações relacionadas com a exploração de óleo e gás, nanopartículas estão constantemente expostas a condições de alta pressão, temperatura, salinidade e contaminantes, que em conjunto podem interferir em suas características físico-químicas e em sua eficiência de aplicação. Para evitar essa interferência, uma das estratégias utilizadas é a funcionalização de nanopartículas, já aplicada para estabilizar dispersões e evitar a formação de agregados/aglomerados de nanopartículas (KIND et al., 2015; SHI et al., 2015). Ainda, essas modificações de superfície também podem garantir que as funções desejáveis do nanomaterial não sejam comprometidas durante sua aplicação pela indústria petroquímica. Um dos métodos de funcionalização mais utilizados é a incorporação de ligantes orgânicos (NEOUZE; SCHUBERT, 2008), como é o exemplo da carboxilação (KHALIL et al., 2014; MEDEIROS; MACHADO; RUBIM, 2015) via reação química. Com a visão de aplicar futuramente nanopartículas durante seu processo de extração de petróleo, a Petrobras possui interesse em uma nova nanopartícula de titânio funcionalizada com ligantes de carboxilato de sódio, um dos exemplos de estratégias já utilizadas pela indústria petroquímica para melhora da aplicação de nanomateriais. Isso exemplifica um cenário em que a partir da fase de síntese é possível moldar as características físico-químicas de nanomateriais para que sua função desejada seja executada.

A empresa PETROBRAS visa a aplicação dessa nanopartícula para a remoção de petróleo residual presente em rochas de exploração, além de ajudar na preservação do material para posteriores explorações e cimentação da rocha (SANTRA; BOUL; PANG, 2012; MURTAZA; RAHMAN; AL-MAJED, 2016). Mesmo após o processo de extração primário, que é baseado na perfuração da rocha e no extravasamento do petróleo, ainda restam bolsões e poros com petróleo confinado. A associação de nanopartículas com surfactantes que interagem com a interface água, rocha e óleo torna possível a retirada desse petróleo residual que é confinado em nanoporos (Figura 2). Com isso, torna-se possível aumentar a quantidade de petróleo extraído de uma rocha em exploração, consequentemente aumentando seu rendimento. Contudo antes da aplicação dessa nanopartícula, é necessário entender quais são suas características físico-químicas, e sobretudo quais os efeitos que a mesma pode provocar frente aos modelos biológicos, a abordagem utilizada nesse trabalho e apresentada a seguir.

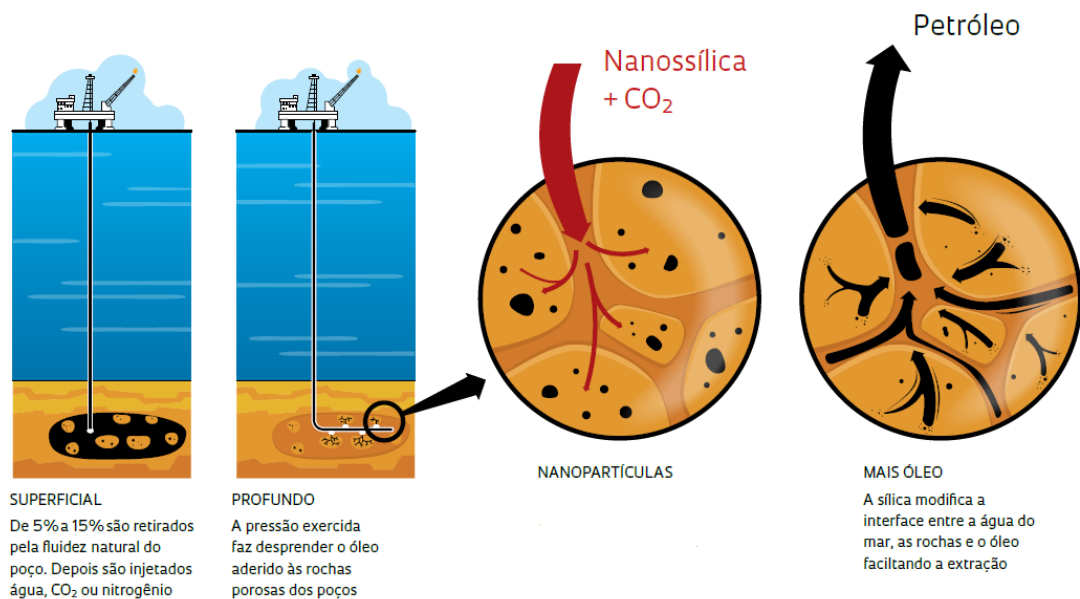


Figura 2. Processo secundário de extração de petróleo com uso associado de nanopartículas. (Adaptada de Poços de Petróleo mais produtivos – Revista FAPESP).

1.3 Nanopartículas de titânio

As nanopartículas de titânio (NPsTiO_2) são consideradas como um dos cinco nanomateriais mais aplicados em produtos de consumo (SHI et al., 2013) devido a capacidade em conferir brilho e opacidade a superfícies e revestimentos. As NPsTiO_2 podem ser compostas por diferentes estruturas cristalinas: anatase, broquito e rutilo (ALLEN, 2016; PANDEY; PRAJAPATI, 2018). Essas estruturas são geradas em função das diferentes interações entre os átomos de oxigênio e o átomo de titânio, sendo que a anatase e o broquito são as formas mais comuns de NPsTiO_2 (Figura 3). Apenas nos Estados Unidos, a produção anual de NPsTiO_2 atingiu 7800 toneladas (BOLAND; HUSSAIN; BAEZA-SQUIBAN, 2014), valor esse que cresce a cada ano, e indica o potencial uso dessa nanopartícula em relação à escala global.

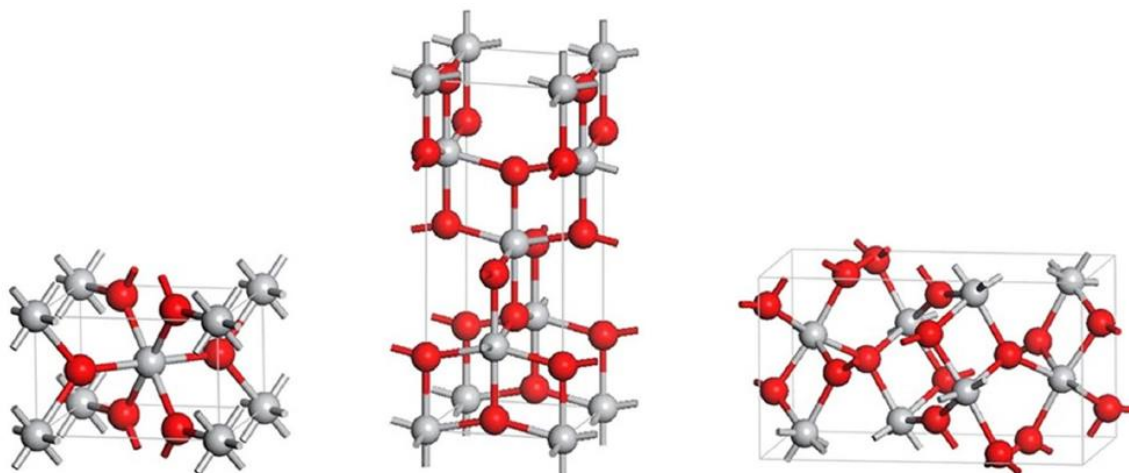


Figura 3. Estruturas cristalinas do dióxido de titânio. No sentido da esquerda para a direita temos a representação do rutilo, anatase e broquito. Adaptada de (SAMAT et al., 2016).

As NPsTiO_2 são utilizadas na composição de diversos materiais de consumo, como cremes, cosméticos, cremes dentais, tintas e revestimentos auto limpantes (PARKIN; PALGRAVE, 2005; SAMAT et al., 2016). Tornaram-se um dos produtos mais engenheirados pela indústria, devido a capacidade de proteção contra a radiação solar, o que justifica seu uso em bloqueadores solares e cosméticos. A indústria alimentícia aplica as NPsTiO_2 em diversos setores de produção (HERINGA et al., 2016; JOVANOVI; CVETKOVI; MITROVI, 2016), com destaque às etapas de processamento e armazenamento de alimentos, e no aumento de tempo de prateleira de diversos produtos devido à sua atividade antibacteriana (RHIM; PARK; HA, 2013).

Na agricultura são utilizadas na produção de pesticidas e fertilizantes com melhoria em parâmetros agrícolas, como qualidade do solo e rendimento no crescimento de plantas e culturas (RAI et al., 2015 ; LIM et al., 2015). As propriedades fotocatalíticas das NPsTiO₂ também são aproveitadas para sistemas de autolimpeza e remoção de resíduos em água e vidros. E na biomedicina são aplicadas no desenvolvimento de dispositivos farmacêuticos, sobretudo os relacionados com a entrega direcionada de fármacos e outros nano dispositivos médicos (PANDEY; PRAJAPATI, 2018). Certamente, outras propriedades físico-químicas, como sua estrutura cristalina, formato e tamanho também estão relacionadas com suas possíveis aplicações industriais.

Ao mesmo tempo que as indústrias em geral utilizam-se dessas principais características físico-químicas das NPsTiO₂ para melhorar a qualidade de produtos e equipamentos, cresce a preocupação acerca da possível interferência das nanopartículas na saúde humana e no meio ambiente. Além disso, é observada a previsão do aumento no mercado de NPsTiO₂ que poderá atingir um valor aproximado de 16 milhões de dólares no ano de 2022 (*Nano Titanium Dioxide Market*, 2016), o que significa um aumento na oferta de produtos com base nessas nanopartículas. Esse cenário culminou na discussão entre a comunidade científica sobre os possíveis efeitos tóxicos das nanopartículas e no surgimento da nanotoxicologia, uma sub-área da nanotecnologia, e que busca avaliar quais são esses efeitos e relacioná-los com as características físico-químicas e o perfil de exposição de nanopartículas.

1.4 A toxicidade de NPsTiO₂

Devido ao grande interesse no uso e aplicação de NPsTiO₂, tornou-se importante avaliar sua biocompatibilidade e toxicidade, uma vez que manipuladores, trabalhadores e consumidores poderão se expor direta ou indiretamente à produtos derivados ou baseados em nanopartículas. Os estudos em nanotoxicologia buscam por modelos biológicos que mimetizam as condições reais de exposição, uma dificuldade da área uma vez que as exposições podem ocorrer em períodos, concentrações e frequência indeterminados. Desde a década de 80, o TiO₂ em microescala é descrito como um material biologicamente e fisiologicamente inerte para humanos e animais (CHEN et al., 1988; HART et al., 1998). Porém, segundo estudos realizados pela IARC (*International Agency for Research on Cancer*) no ano de 2006, as NPsTiO₂ e seus derivados

possuem diferente reação frente aos sistemas biológicos sendo inseridas na classe de potenciais carcinógenos (grupo 2B) principalmente quando veiculados através da via inalatória. O FDA (*Food and Drug Administration*) também determinou a aprovação de limites para uso das NPsTiO₂ em bloqueadores solares de até 25% (w/w) baseado em avaliações de toxicidade considerando uma ingestão acidental do produto em exposição à modelos animais.

No Brasil, até o ano de 2020, não existe uma legislação específica que regule o uso de nanopartículas, e considerando a ampla disponibilidade de nanomateriais no mercado, torna-se uma tarefa trabalhosa determinar um padrão de toxicidade que seja aplicado a todos os tipos de nanomateriais. Os relatos em literatura procuram relacionar a composição cristalina das NPsTiO₂, a presença ou não de ligantes ou modificações de superfície, o diâmetro, carga elétrica, dentre outras propriedades físico-químicas que poderiam causar efeitos tóxicos (JOHNSTON et al., 2009). Uma vez que o comportamento das nanopartículas em meio biológico é dependente das interações químicas e físicas com o ambiente celular (SEATON, 2006) e DROBNE, 2007), estudá-las pode ser um caminho para elucidar quais são os mecanismos de toxicidade.

Os primeiros estudos com o objetivo de avaliar os efeitos tóxicos do dióxido de titânio observaram uma relação entre o tamanho das partículas com a promoção de toxicidade, visto que partículas ultrafinas (30 nm) apresentaram maior translocação e retenção na região pulmonar de ratos em comparação com partículas de tamanho maior (0,25 µm). Essa maior retenção foi capaz de provocar um processo inflamatório nos pulmões dos modelos animais (FERIN et al., 1988; OBERDORSTER et al., 1990). Isso pode ser justificado pela redução do tamanho de uma partícula, o que torna sua área superficial aumentada, permitindo uma maior interação e reatividade com os sistemas biológicos, considerado como um dos fatores mais críticos para a determinação de toxicidade frente aos modelos *in vitro* e *in vivo* (NAPIERSKA et al., 2009; THOMASSEN et al., 2010). Dessa forma, é demonstrado que quanto menor for uma NP TiO₂, maior pode ser a promoção de toxicidade (KUMAZAWA et al., 2002).

Contudo, além do tamanho em nano-escala, a toxicidade de NPsTiO₂ pode estar relacionada com outras propriedades físico-químicas, como o nível de aglomeração/agregação das nanopartículas, sua estrutura cristalina, formato, carga líquida e modificações presentes em sua superfície (JOHNSTON et al., 2009). Em relação à estrutura cristalina, é visto que a anatase é a forma mineral que apresentou maior citotoxicidade frente aos modelos *in vitro*, com efeitos tóxicos duas vezes maiores do que a forma mineral rutilo (SAYES et al., 2006). Além disso, também é descrita a ocorrência de efeitos tóxicos de NPsTiO₂ com estrutura cristalina composta por anatase (SIMON-DECKERS et al., 2008). Uma das hipóteses é de que a anatase promova maior toxicidade devido à sua capacidade fotocatalítica.

Portanto, a caracterização físico-química é uma etapa importante na avaliação toxicológica, uma vez que contribui ao entendimento da interação célula-nanopartícula, do processo de internalização e da ocorrência de efeitos tóxicos (LOURO, 2018). Os principais mecanismos relacionados com a promoção de toxicidade são: o estresse oxidativo, o dano ao material genético, a inflamação e os efeitos imunomodulatórios (DUSINSKA et al., 2011). Dentre esses mecanismos, a avaliação de danos ao DNA possui a maior discrepância dentre os achados descritos em literatura, uma vez que características físico-químicas tão variadas e o uso de modelos celulares com diferentes susceptibilidades à exposição com nanopartículas, fornecem resultados contraditórios.

A nanogenotoxicologia visa entender como e quais os efeitos dos nanomateriais ao interagirem com o material genético (DNA), podendo assim provocar danos como a quebra da dupla fita e a indução de mutagênese (AZQUETA; DUSINSKA, 2015). Os mecanismos de genotoxicidade ainda não estão elucidados detalhadamente, mas até o momento sabe-se que podem ser desencadeados via contato direto ou indireto com as nanopartículas, respectivamente conhecidos como mecanismo primário e secundário. Em função do tamanho das nanopartículas e da capacidade de internalização pelas células, essas podem atravessar a membrana nuclear e interagir com o DNA, prejudicando os processos de replicação e transcrição, além da geração de danos oxidativos (MAGDOLENOVA et al., 2014). Já os mecanismos de genotoxicidade secundários relacionam-se com a geração de espécies reativas de oxigênio resultantes do processo de fagocitose, principalmente em processos inflamatórios, que causam lesões ao DNA (STONE; JOHNSTON; SCHINS, 2009).

Dentre os estudos de nanogenotoxicidade, o de Jugan e seus colaboradores em 2012, avaliou os efeitos genotóxicos de uma série de NPsTiO₂, com tamanho variado entre 12 e 140 nm, utilizando células de carcinoma alveolar humano A549. Por meio de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) a NP TiO₂ de menor tamanho (12 nm) foi visualizada sobretudo no citoplasma, internalizada por vesículas celulares e até presentes no núcleo celular quando exposta durante 4 h na concentração de 50 µg/mL (Figura 4). Além disso, a indução de quebras de fita simples e danos oxidativos ao DNA foi um dos resultados encontrados para essa NP TiO₂. Isso evidencia a importância de se estudar os efeitos a curto e longo prazo de nanopartículas sob o material genético, uma vez que são capazes de acessar o núcleo celular em função do seu tamanho.

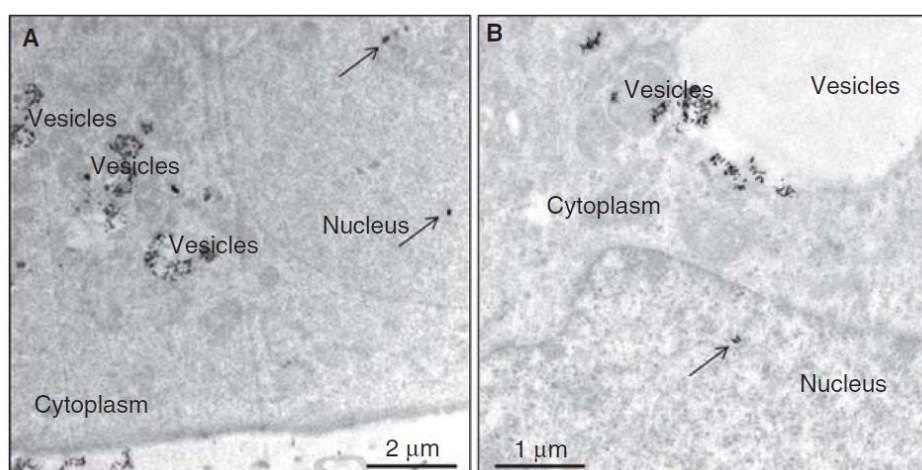


Figura 4. Acúmulo intracelular de NP TiO₂ após exposição de 4h em concentração de 50 µg/mL em células A549 visualizado por MEV. Adaptado de (JUGAN et al., 2012a).

Para complementar os estudos de genotoxicologia, é possível combinar o uso de diferentes modelos celulares que forneçam uma resposta representativa da interação das nanopartículas com tecidos e até órgãos. Com isso, no caso das nanopartículas de titânio, destacam-se os modelos pulmonares e dérmicos (JOHNSON et al., 2010), visto que a forma em pó pode ser inalada e a aplicação de produtos que contém NPsTiO₂ na epiderme são as principais vias de exposição. Como exemplo, os autores utilizaram a combinação de linhagens celulares que mimetizam o ambiente pulmonar, como é o caso da A549 em associação com a linhagem BEAS-2B que se aproxima das características do epitélio dessa região (KE et al., 1988; BIOLA-CLIER et al., 2017).

Além da genotoxicidade, as NPsTiO₂ também são avaliadas quanto aos seus efeitos imunomodulatórios em modelos *in vitro*. Segundo a literatura é indicado que essas nanopartículas podem induzir a ativação de células do sistema imune (macrófagos; células dendríticas) com a consequente produção de fatores pró-inflamatórios (LAPPAS, 2015). Isso foi visto para nanopartículas de titânio que induziram o aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-8 e IFN- γ) após exposição à linhagem de monócitos periféricos PBMCs (SCHANEN et al., 2009). Em células da microglia, as NPsTiO₂ também modularam a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β e IL-6) com o aumento na quantificação em concentrações de 0,25 e 0,5 mg/mL em relação à células não expostas à nanopartícula (XUE; WU; SUN, 2012). Para auxiliar na compreensão dessas respostas, também há o interesse em estudar e relacionar a alteração na expressão de fatores de transcrição pelas NPsTiO₂ com a produção de citocinas em fagócitos, sobretudo de fatores ligados à promoção e regulação do processo inflamatório, como os STATs (*Signal Transducers and Activators of Transcription*) e o fator nuclear kB (NF-kB).

A via de sinalização do NF-kB é responsável pela ativação da transcrição de genes, como o *TNF- α* e o *IL1*, que possuem função primária no desenvolvimento de atividades pró-inflamatórias. As principais atividades desencadeadas por essa via relacionam-se com a resposta de fagócitos contra vírus e bactérias (MEDZHITOV; HORNG, 2009; LIU et al., 2017) e desenvolvimento de células da imunidade adaptativa (CILDIR; LOW; TERGAONKAR, 2016). Dessa forma, o fator de transcrição NF-kB pode ser um interessante marcador para o estudo da imunomodulação de nanopartículas em modelos *in vitro*, uma vez que já é descrita a participação de NPsTiO₂ na ativação do NF-kB e no aumento da expressão de genes que codificam para citocinas pró-inflamatórias em macrófagos RAW 264.7 (GIOVANNI et al., 2015). Os STATs também são responsáveis pela imunomodulação, atuando na polarização de macrófagos, como é o caso do *STAT3* e *STAT6*, e na produção de citocinas, como a IL-4, IL-10 e IL-13 (TUGAL; LIAO; JAIN, 2013). Dentre os diferentes tipos de fatores envolvidos, é necessário considerar a atuação sinérgica de fatores de transcrição e citocinas para elucidar os mecanismos de imunomodulação de nanopartículas de forma completa.

Dentre os passos para avaliar a citotoxicidade, genotoxicidade e a imunomodulação por nanopartículas é importante em primeiro lugar selecionar uma linhagem celular adequada e que responda frente aos testes *in vitro* em função das possíveis aplicações e usos do nanomaterial. Após a seleção da linhagem celular, um requisito para a avaliação da genotoxicidade de um nanomaterial, é definir um intervalo de doses e períodos teste de exposição com base em seu potencial citotóxico e compreender como os modelos celulares se comportam frente à exposição do nanomaterial. Sendo assim, a empresa Petrobras possui interesse em estudar novos nanomateriais que possam ser aplicados pela indústria petroquímica, como descrito no item 1.2. Esse interesse nasceu da necessidade de conhecer melhor os principais efeitos tóxicos de novos nanomateriais antes mesmo que uma regulamentação oficial brasileira fosse imposta para empresas.

Assim, o presente trabalho é justificado no principal interesse da Petrobras em aplicar e avaliar a toxicidade de uma série de nanopartículas de interesse industrial, dentre elas, uma nova NP TiO₂. Essa nova nanopartícula foi desenhada durante sua síntese para apresentar uma maior solubilidade em água em relação aos nanomateriais disponíveis em mercado, além de possuir maior biocompatibilidade e aplicabilidade para a indústria petroquímica devido à funcionalização com ligantes de carboxilato de sódio (CO₂⁻Na⁺). Esse trabalho foi a etapa inicial da análise toxicológica dessa nanopartícula baseada em modelos *in vitro*. Os primeiros modelos celulares selecionados foram as linhagens celulares de fibroblastos e macrófagos de camundongos para avaliar a cito e genotoxicidade dessa nova NP TiO₂.

Portanto, a hipótese testada foi de que essa nanopartícula apresente uma maior biocompatibilidade quando exposta aos cultivos celulares uma vez que foi sintetizada com essa finalidade, sendo que até o momento essa nanopartícula não havia sido testada biologicamente em modelos *in vitro*. Em seguida, as hipóteses testadas foram em relação aos efeitos genotóxicos dessa nanopartícula e a avaliação da atividade inflamatória frente aos macrófagos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Avaliar a ocorrência de efeitos citotóxicos de uma nova nanopartícula de titânio (NP TiO₂) de interesse para a indústria petroquímica após sua exposição à linhagem de macrófagos J774A.1 e seu papel na ativação intracelular e na resposta inflamatória. E a ocorrência de efeitos cito e genotóxicos da NP TiO₂ após sua exposição à linhagem de fibroblastos LA-9.

2.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos nesse trabalho foram:

- Caracterizar a NP TiO₂ com base em suas principais propriedades físico-químicas (tamanho e carga) via Espalhamento Dinâmico da Luz (DLS) e determinação do potencial-zeta.
- Avaliar a citotoxicidade da NP TiO₂ após sua exposição (24, 48, 72 e 96 h) a fibroblastos de camundongos LA-9 via Ensaio de citotoxicidade com MTT.
- Avaliar a ocorrência de dano ao DNA induzida pela NP TiO₂ após sua exposição (24 h) a fibroblastos de camundongos LA-9 via Ensaio Cometa.
- Avaliar a citotoxicidade da NP TiO₂ após sua exposição (24, 48, 72 h) a macrófagos de camundongos J774A.1 via Ensaio de citotoxicidade com MTT.
- Avaliar o perfil de produção de citocinas (IL-10, TNF- α e IL-12) em macrófagos de camundongos J774A.1 após exposição à NP TiO₂ via ELISA direto.
- Avaliar a expressão de genes relacionados ao processo inflamatório (*Nos2*, *Stat6* e *Nf-kb*) após a exposição de macrófagos de camundongos J774A.1 à NP TiO₂ via qRT-PCR.

3. MATERIAL E MÉTODOS

A Figura 5 é um resumo dos principais métodos e ensaios selecionados para avaliar a citotoxicidade, genotoxicidade e a resposta inflamatória da nova NP TiO₂.

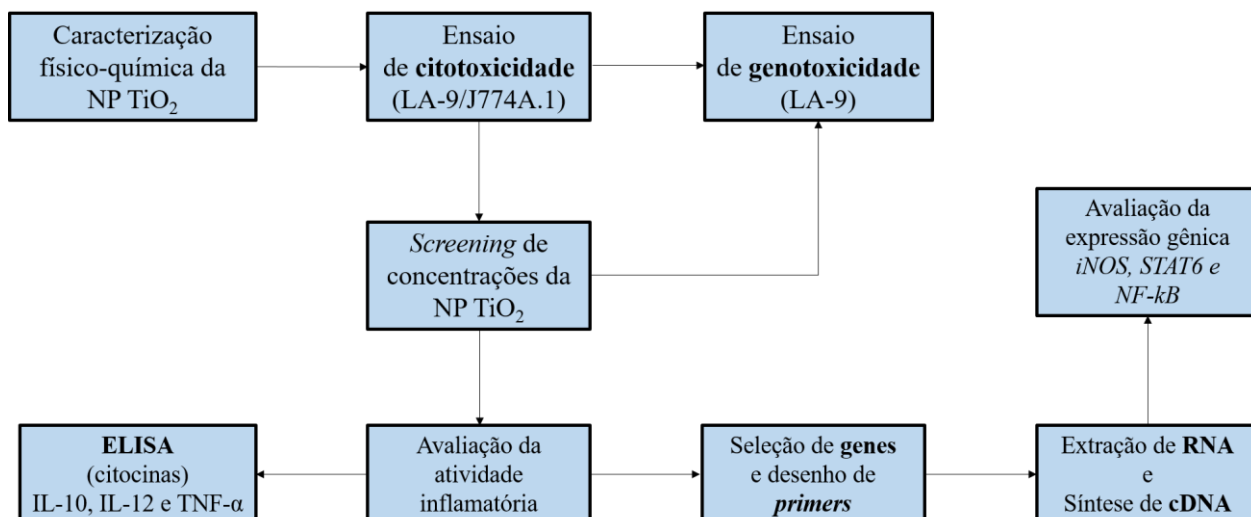


Figura 5. Organograma experimental dos principais tópicos metodológicos.

3.1 Nanopartícula de titânio

A nova nanopartícula de titânio, denominada nesse trabalho de NP TiO₂ foi sintetizada pela equipe do Prof. Dr. Koiti Araki do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP) em parceria com a empresa Petrobras. A NP TiO₂ foi enviada em forma sólida (pó) e segundo sua ficha de caracterização (Tabela 1) é composta por núcleos de dióxido de titânio em sua forma mineral unicamente formada por anatase. A NP TiO₂ dispersa em água ultrapura possui tamanho de 2,5 a 3 nm, determinado por microscopia eletrônica de transmissão (MET) e, também, por espalhamento dinâmico da luz (DLS). Além disso, a NP TiO₂ possui ligantes com grupos carboxilato de sódio (CO₂⁻Na⁺) com a formação de uma dispersão homogênea em água (pH 4-10) em uma concentração de até 40% m/m de nanopartícula.

Tabela 1. Resumo das características primárias da NP TiO₂. Os dados apresentados foram fornecidos pelo grupo do Laboratório do Prof. Dr. Koiti Araki, sob supervisão da empresa Petróleo Brasileiro S.A (PETROBRAS). Os dados foram obtidos via microscopia eletrônica de transmissão (MET) e espalhamento dinâmico da luz (DLS).

Características primárias da NP TiO₂	
Composição	Núcleos de dióxido de titânio
Forma cristalina	Anatase (100%)
Tamanho primário	2,5 a 3 nm
Funcionalização	Ligantes com grupos terminais carboxilato de sódio
Dispersão	Água (pH 4-10) 40 % m/m

3.2 Caracterização da nova NP TiO₂

Para a caracterização da NP TiO₂, foram preparadas três dispersões de nanopartícula em concentrações utilizadas nos ensaios *in vitro* (1000, 100 e 10 µg/mL) em meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Sigma-Aldrich) sem fenol e em água ultrapura Milli-Q. A NP TiO₂ foi caracterizada por DLS em DMEM para a determinação do tamanho hidrodinâmico médio (*z-average*) e índice de polidispersividade (PsI). Foi também determinado o potencial-zeta da NP TiO₂ dispersa em água Milli-Q.

Todas as análises foram realizadas no Laboratório de Nanomedicina do Instituto de Física da Universidade de São Paulo (IFSC/USP) em um *Zetasizer nano* (ZS90). As medições foram realizadas com 1 mL de cada dispersão, sendo realizadas três medições com leituras de intensidade e volume em função do tamanho da NP TiO₂. Ao final, os dados foram analisados e compilados para a geração dos índices de caracterização da nanopartícula.

3.3 Linhagens celulares

Os cultivos *in vitro* para exposição e testes da NP TiO₂ foram realizados com as linhagens celulares aderentes de fibroblastos LA-9 e de macrófagos J774A.1 (ATCC[®] TIB-67[™]) de camundongos, devido a suas participações respectivamente em mecanismos de reparo celular/tecidual e resposta inflamatória.

Os cultivos e manutenção de fibroblastos foram realizados em meio de cultura DMEM suplementado com soro fetal bovino 10% (LGC Biotecnologia) e antibiótico 1% (Estreptomicina/Penicilina 0,1 g/L– Sigma-Aldrich). Para os macrófagos, foi utilizado o meio de cultura RPMI (*Roswell Park Memorial Institute Medium*) suplementado com soro fetal bovino 10%, L-glutamina 0,146 g/L, bicarbonato de sódio 3,7 g/L e antibiótico 1%.

3.4 Cultivo de fibroblastos LA-9 e macrófagos J774A.1

Os cultivos de fibroblastos e macrófagos foram realizados primeiramente em frascos de cultura tipo T (KASVI - 75 cm²) com confluência de até 80% para a realização dos ensaios. Em seguida, para a exposição à NP TiO₂ os cultivos celulares foram transferidos para placas de microtitulação com 96 poços ou placas de cultivo com 24 poços. Para isso, o meio de cultura foi desprezado e o frasco de cultura lavado com 10 mL de tampão fosfato-salino 1x (PBS 1x). Em seguida, foi adicionado 4 mL da enzima tripsina/EDTA 0,25% 1x (LGC Biotecnologia) e o frasco mantido em incubadora a 37°C e 5% de CO₂ durante 5 minutos. Após o tempo de ação da enzima, o frasco foi levado ao microscópio invertido para a visualização do desprendimento das células. Em seguida, a tripsina foi inibida pela adição de 6 mL de DMEM completo (SFB 10%) e o conteúdo do frasco foi transferido para um tubo de microcentrifugação. A suspensão celular foi centrifugada a 423 x g durante 5 minutos, o sobrenadante descartado e o precipitado de células ressuspendido em 1 mL de DMEM completo. Em seguida, as células foram diluídas (1:20) em azul de Trypan (0,4%) e meio de cultura para a contagem total de células viáveis em câmara de Neubauer.

Para o cultivo de macrófagos J774A.1 em placas de 96 e 24 poços, os procedimentos realizados foram semelhantes aos descritos anteriormente para fibroblastos, com exceção de que o desprendimento celular foi realizado por ação mecânica. Após o meio de cultura ter sido desprezado do frasco de cultura, foi adicionado 4 mL de meio RPMI completo e as células foram desprendidas com auxílio de um *scraper* plástico (KASVI) em movimentos unidirecionais.

3.5 Ensaio de citotoxicidade (MTT)

O ensaio colorimétrico quantitativo com MTT foi empregado para avaliar a viabilidade dos fibroblastos e macrófagos após a exposição à NP TiO₂. (Figura 6). O ensaio baseia-se na capacidade das células viáveis em metabolizar o sal tetrazólico brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio e gerar cristais de formazana que são solubilizados e produzem uma alteração colorimétrica detectável por um espectrofotômetro de múltiplos poços (MOSMANN, 1983).

Para o ensaio de citotoxicidade da NP TiO₂ em fibroblastos e macrófagos, as concentrações testadas foram de 2000, 1000, 100, 10 e 0,1 µg/mL nos períodos de exposição de 24, 48 e 72 h. Adicionalmente em fibroblastos, foi realizada a exposição no período de 96 h. Todas as exposições à NP TiO₂ foram realizadas em seis replicatas amostrais e os ensaios foram realizados no mínimo em três réplicas independentes. Todas as suspensões de NP TiO₂ foram preparadas previamente as exposições a partir da diluição simples de uma suspensão na concentração de 2000 µg/mL. Para isso, foi pesado 0,02 g de NP TiO₂ e solubilizado em 10 mL de meio de cultura (DMEM e RPMI) e a suspensão foi agitada vigorosamente durante 1 minuto em aparelho tipo vórtex (BioMol).

A exposição da nanopartícula aos cultivos celulares de fibroblastos e macrófagos foi realizada em placas de microtitulação com 96 poços (KASVI). De acordo com a contagem do número de células, essas foram semeadas nas placas nas concentrações de 3x10⁴ células/mL e 1x10⁵ células/mL respectivamente para fibroblastos e macrófagos. Para todos os ensaios, as placas apresentaram controle negativo que representa as células sem exposição à NP TiO₂ e o controle positivo que representa as células expostas ao detergente enzimático e conjunto de tensoativos Extran 5% (Merck®).

Após o cultivo em placa, as células foram mantidas em incubadora (Thermo-Fischer) durante 24 h a 37°C e 5% CO₂ para adesão das células a superfície dos poços. Em seguida, o meio de cultura foi desprezado e a cada poço adicionado 200 µL da suspensão de NP TiO₂ nas concentrações descritas acima com auxílio de um pipetador multicanal. Cada placa foi mantida em incubadora a 37°C e 5% CO₂ durante o seu respectivo tempo de exposição (24, 48 ou 72 h).

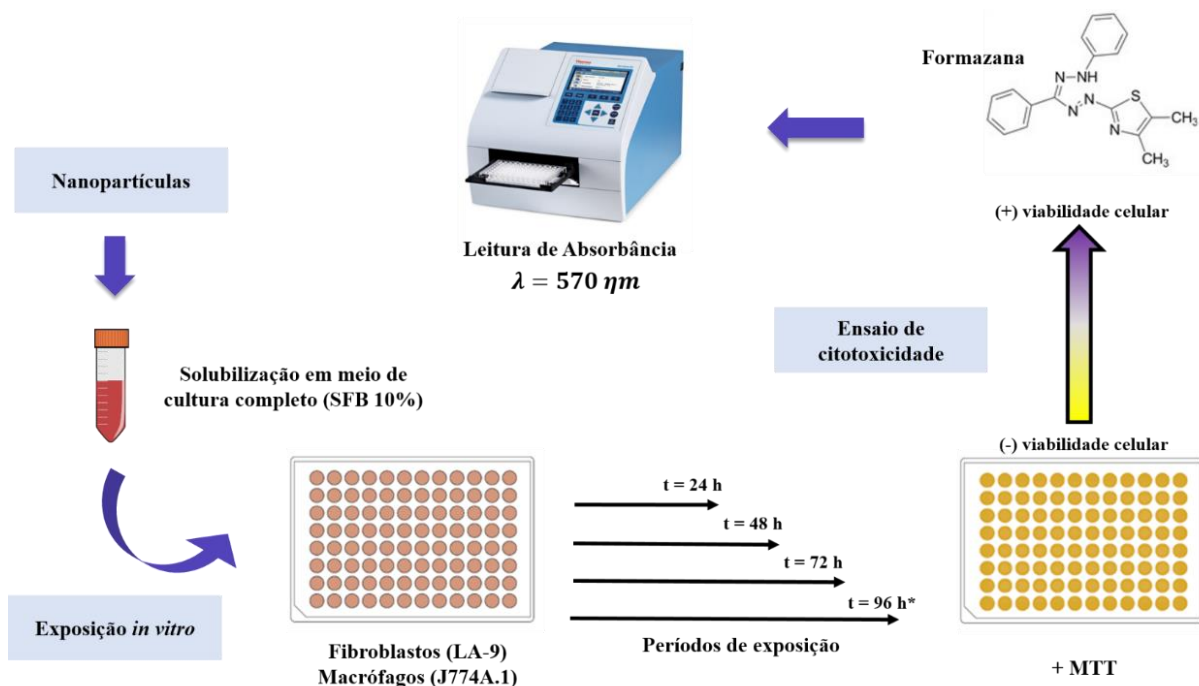


Figura 6. Resumo do ensaio de citotoxicidade para a NP TiO₂ em fibroblastos LA-9 e macrófagos J774A.1. * apenas para a linhagem de fibroblastos LA-9 foi analisada a citotoxicidade da NP TiO₂ no período de exposição de 96 h.

Ao final de cada período, os tratamentos com nanopartícula foram descartados da placa e cada poço foi lavado com 200 μL de PBS 1x para remoção de volumes residuais dos tratamentos. Em seguida, a cada poço foi adicionado 100 μL de uma solução de MTT (0,5 mg/mL – Sigma Aldrich) e as placas foram mantidas em incubadora a 37°C e 5% CO₂ durante no máximo 4 h. Para a solubilização dos cristais de formazana foram adicionados a cada poço 100 μL de dimetilsulfóxido (DMSO - Sigma-Aldrich). As placas foram imediatamente analisadas em um leitor de placas *MultiScan Go* (Thermo-Fischer) sob agitação contínua durante 40 s e as leituras de absorvância foram realizadas em comprimento de onda igual a 570 nm.

Após a leitura das placas, todos os valores de absorvância foram subtraídos dos valores de poços que apresentavam apenas DMSO (BRANCO). E a viabilidade das células foi calculada para cada concentração e períodos de exposição segundo os valores de absorvância em relação ao controle negativo, que representa 100% da viabilidade celular (Equação 1).

$$Viabilidade\ celular\ (\%) = \frac{Abs\ tratamento \times 100}{Abs\ controle\ negativo}$$

Equação 1. Cálculo da viabilidade celular para o ensaio de citotoxicidade com MTT.

3.6 Quantificação de IL-10, TNF- α e IL-12 via ensaio imunoenzimático (ELISA)

A exposição de culturas de macrófagos a estímulos inflamatórios desencadeia a secreção de classes de citocinas pró e/ou anti-inflamatórias em meio de cultura, como é o caso dos marcadores inflamatórios IL-10, TNF- α e IL-12 (DUQUE; DESCOTEAUX, 2014). A dosagem das respectivas citocinas foi realizada a partir da coleta em *pool* de 200 μ L dos sobrenadantes celulares após exposição a 1000, 100 e 10 μ g/mL de NP TiO₂ concomitantemente ao ensaio de citotoxicidade com MTT. Os kits utilizados foram específicos para IL-10 (*Cat. Number 555252 BD Biosciences*), TNF-A- α (*Cat. Number 555268 BD Biosciences*) e IL-12 (p70) (*Cat. Number 555256 BD Biosciences*). Para o ELISA foram utilizadas placas com 96 poços, sensibilizadas inicialmente com a adição de 100 μ L/poço de solução contendo o anticorpo de captura primário anti cada citocina, diluído em tampão fosfato para IL-10, TNF- α e IL-12, os quais são responsáveis por reconhecer cada uma das citocinas. Em seguida, as placas foram incubadas por 18 h a 4°C.

Após esse período, o sobrenadante foi descartado, e as placas foram lavadas três vezes com tampão de lavagem (PBS Tween 0,05%) e o bloqueio dos sítios de ligações inespecíficas foi realizado com 200 μ L/poço de albumina 1%. As placas foram incubadas por 1 h a temperatura ambiente e em seguida lavadas três vezes novamente. A seguir foram adicionadas as diferentes diluições da citocina recombinante padrão específica para reconhecimento de cada uma das citocinas selecionadas e as amostras de sobrenadante celular (50 μ L/poço). Após incubação por 2 horas a temperatura ambiente, foi realizada uma nova lavagem e adicionado 100 μ L/poço do anticorpo de detecção anti cada uma das citocinas (anticorpo secundário biotilado). Após nova incubação de 1 hora à temperatura ambiente e novo ciclo de lavagem, foram adicionados 100 μ L/poço da enzima estrepto-avidina diluída em PBS e albumina 1%. Após 30 minutos a placa foi lavada e adicionado 100 μ L/poço do substrato. O substrato utilizado foi uma mistura 1:1 de solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e solução de tetrametilbenzidina (TMB). Por fim, a reação foi bloqueada adicionando-se 50 μ L/poço de ácido sulfúrico (H₂SO₄). A leitura da absorbância foi realizada no comprimento de onda de 450 nm utilizando o leitor *MultiSkán Go* (Thermo Fischer). A quantificação em μ g/mL foi realizada com base na curva padrão construída para cada citocina.

3.7 Ensaio de genotoxicidade (Cometa)

A avaliação da genotoxicidade da NP TiO₂ foi realizada via Ensaio Cometa, considerado um padrão-ouro na área de nanogenotoxicidade e que permite identificar a ocorrência de quebras de DNA derivadas de origem oxidativa e de sítios abásicos ou instáveis (RR et al., 2000; SINGH et al., 2009). Assim, foi avaliado a presença de possíveis danos ao DNA após exposição de fibroblastos LA-9 à NP TiO₂ realizado em duas repetições independentes e com no mínimo duas amostras biológicas por concentração testada.

Todas as exposições foram realizadas em placas de cultivo de 24 poços (KASVI) nas concentrações de 100, 10 e 1 µg/mL de NP TiO₂ durante o período de 24 h. Para isso, os fibroblastos foram semeados em placa na concentração de 2,5x10⁵ células/poço e as células mantidas em incubadora durante 24 h a 37°C e 5% de CO₂ para adesão e estabilização celular. Após esse período, o meio de cultura foi descartado e adicionado 1 mL de cada um dos tratamentos com a NP TiO₂. Além dos grupos de exposição ao nanomaterial, a análise apresentou um grupo controle negativo (C⁻) - sem exposição à NP TiO₂ e um grupo de controle positivo (C⁺) - exposição à solução de metanossulfonato de metila 70 µM, um alquilante, carcinógeno e indutor de quebras de dupla fita de DNA.

Após o período de exposição, todos os tratamentos foram desprezados e as células em placa foram lavadas duas vezes com 1 mL de tampão PBS 1x. Após a etapa de lavagem para remoção de resíduos celulares e dos tratamentos, foi adicionado a cada poço 300 µL de tripsina/EDTA 0,25% 1x e a placa foi incubada a 37°C durante 5 minutos. Em seguida, foi adicionado 500 µL de DMEM completo para inibição da enzima e os poços foram homogeneizados até a remoção completa das células aderidas. Para a coleta das células, as suspensões de cada poço foram transferidas para microtubos de 1,5 mL e centrifugados a 219 x g durante 5 minutos. Todos os precipitados celulares foram ressuspensos em 500 µL de DMEM completo para a transferência das células em lâminas para eletroforese.

Para prosseguir com a eletroforese em lâmina todas as suspensões celulares devem apresentar um valor de viabilidade celular $\geq 70\%$. Assim, para a análise de viabilidade das células, foi realizado o método de coloração exclusiva com Azul de Trypan, sendo que 20 μL de suspensão celular foram misturados com 20 μL de azul de Trypan 0,4 % e realizada a contagem diferencial de células brancas (viáveis) e azuis (inviáveis). A contagem foi realizada até 100 células/ lâmina via microscopia óptica de luz.

Em seguida, 20 μL de suspensão celular foram misturados com 120 μL de agarose LMP 0,5% (*Low Melting Point*, Invitrogen) a 37°C preparada em PBS 1x. Em cada lâmina pré-gelatinizada com agarose comum 1,5 % foi pingado 140 μL da mistura de células com agarose LMP e foi utilizado uma lamínua de 24x50 mm para cobrir as lâminas. Em seguida, cada lâmina foi incubada a 4°C durante 20 minutos e as lamínulas retiradas cuidadosamente e transferidas para uma cubeta de vidro preenchida com solução de lise gelada recém-preparada contendo 89 mL de solução de lise estoque (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM e Tris 10 mM com pH ajustado para 10), 1 mL de Triton X-100 (Sigma-Aldrich) e 10 mL de DMSO (Synth). Para a linhagem de fibroblastos LA-9 a etapa de lise celular foi realizada a 4°C durante 1,5 h.

A partir dessa etapa o núcleo celular foi exposto e, portanto, todas as etapas a seguir foram realizadas na ausência de luz. Após a lise das células, as lâminas foram transferidas e dispostas em uma cuba de eletroforese horizontal (Bio-rad) preenchida com solução tampão gelada (EDTA-tritriplex 200 mM, NaOH 10N pH >13) recém-preparada durante 20 minutos para desnaturação do DNA. Para todas as lâminas a eletroforese foi realizada em campo elétrico a 28 V (0,8 V/cm) e corrente de aproximadamente 300 mA durante 20 minutos. As condições de eletroforese utilizadas estão de acordo com a versão alcalina do Ensaio Cometa, que avalia a presença de danos primários ao DNA (quebras de fita dupla e simples, sítios álcali-lábeis, sítios abásicos, sítios incompletos de reparo e *crosslinks* DNA-DNA e DNA-proteínas).

Ao final da eletroforese, as lâminas foram incubadas três vezes com solução de neutralização (Tris 0,3 M pH=7,5) durante 5 minutos. Em seguida, as lâminas foram secas a temperatura ambiente e fixadas em etanol absoluto P.A (Synth) durante 10 minutos. As lâminas foram armazenadas a 4°C até o momento da análise. Para a visualização dos nucleóides em cada lâmina, foram adicionados 50 μL de solução *Gel Red* 3x (Biotium) e as lâminas cobertas com lamínula 24x50 mm. Imediatamente, as lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência (Olympus) com filtro de excitação de 510-560 nm e filtro de barreira de 590 nm.

A ocorrência de danos ao DNA foi avaliada visualmente e manualmente pela análise e contagem de até 100 nucleóides por lâmina, totalizando um número de 400 a 500 nucleóides por concentração de NP TiO₂. Para classificar os diferentes graus de indução de dano ao DNA, foi considerado o tamanho das caudas formadas em relação a cabeça dos cometas (Figura 7), sendo que as classes consideradas foram: classe 0 - ausência de danos visíveis no DNA; classe 1 – dano pequeno; classe 2 – dano médio; classe 3 – dano grande (KOBAYASHI et al., 1995).

O escore foi calculado pela multiplicação do número de nucleóides pertencentes a cada classe, pelo número da classe correspondente, segundo a fórmula:

$$\text{Score} = \sum_{i=0}^3 ni \times i$$

onde ni é o número de nucleóides de classe i e i é classe do dano (0, 1, 2, 3).

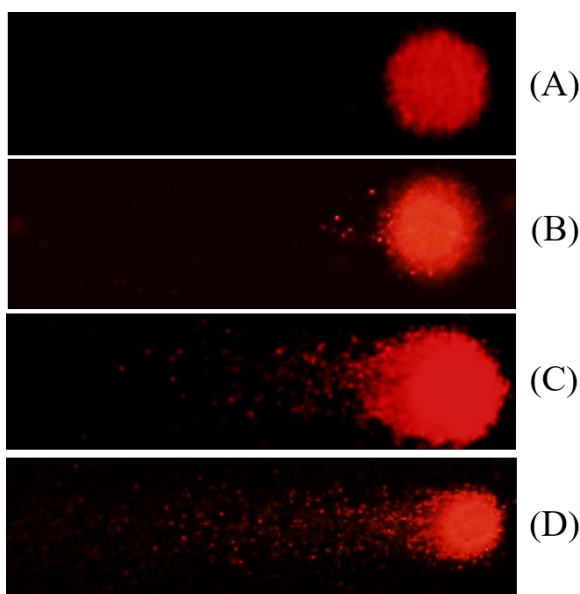


Figura 7. Avaliação visual para nomenclatura de classificação dos cometas em classe 0 (A) – sem dano, classe 1 (B) – dano pequeno, classe 2 (C) – dano intermediário e classe 3 (D) – dano alto. As imagens foram fotografadas em um microscópio de fluorescência no aumento de 20x (filtro rodamina).

3.8 Avaliação da expressão dos genes *Nos2*, *Stat6* e *Nfkb* em macrófagos via qRT-PCR.

3.8.1 Seleção dos alvos moleculares e desenho de *primers*

Com base nos resultados obtidos via ensaio imunoenzimático (ELISA) buscou-se avaliar a expressão gênica de possíveis alvos moleculares que podem estar relacionados com o perfil de produção de citocinas observado após a exposição à NP TiO₂. Em macrófagos a polarização dessas células é classicamente descrita como um evento que diferencia duas populações (M1 e M2) que estão em estados diferentes de ativação, sendo uma com atividade pró-inflamatória e outra anti-inflamatória respectivamente (TUGAL; LIAO; JAIN, 2013). Além disso, o controle da transcrição de genes é um importante ponto da via regulatória para o entendimento do processo de polarização de macrófagos.

Assim, foram selecionados os genes alvo *Nos2*, *Stat6* e *Nfkb* que codificam respectivamente para a óxido nítrico sintase induzível (iNOS), STAT-6 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 6*) e NF-κB (*Factor Nuclear Kappa B*) que são descritos como importantes fatores que coordenam a polarização clássica em macrófagos (TUGAL; LIAO; JAIN, 2013). Além dos genes de interesse, foram selecionados os genes *Tubb2a* e *Hmbs* que codificam respectivamente para 2-β-microtubulina (B2M) e para a enzima hidroximetilbilano sintase (HMBS) e que foram utilizados como normalizadores da expressão gênica, uma vez que são genes descritos para macrófagos de camundongos e caracterizados por sua expressão estável e independente dos tratamentos (STEPHENS; STEPHENS; MORRISON, 2011).

Para o desenho dos oligonucleotídeos iniciadores de reação (*primers*), as sequências codificadoras dos respectivos genes foram buscadas e extraídas do banco de dados de nucleotídeos do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) para *Mus musculus*. Uma sequência codificadora foi selecionada como candidata para a realização de um alinhamento local (BLASTn) para encontrar outras sequências referentes aos genes de interesse e que apresentavam um elevado valor de similaridade ($\geq 90\%$) dentro dos parâmetros de alinhamento. Todas as sequências que preencheram os requisitos de similaridade no BLASTn e que pertenciam à *Mus musculus* foram analisadas posteriormente para o desenho dos *primers*.

Para cada gene foram definidas regiões que possuíam elevada complementariedade de pares de base via realização de um alinhamento múltiplo e global de todas as sequências no *software* CLUSTAL W (*Multiple Sequence Alignment*). Assim, foi gerada uma sequência codificadora consenso para cada gene e que foi utilizada para o desenho dos pares de *primers*. Todos os pares de *primers* (Tabela 2) foram desenhados para aplicação em qRT-PCR seguindo características como: tamanho do fragmento de amplificação gerado (entre 100 e 150 pb), formação de estruturas secundárias entre os *primers* (hairpins, homo e hetero dímeros) e distância dos *primers* em relação à extremidade 3'. Após o desenho, cada sequência de *primers* foi analisada no *software* Oligo Analyzer (IDT) para confirmação e seleção do melhor design para aplicação na PCR em Tempo Real.

Tabela 2. Informações sobre os pares de primers desenhados para avaliação da expressão gênica em macrófagos após exposição à NP TiO₂ via qRT-PCR.

Símbolo	Número de Acesso	Sequência Forward (5'-3')	Sequência Reverse (5'-3')	Fragmento amplificado (pb)
<i>Tubb2m</i>	NM_009735	TACGTAACACAGTTCCACCC	TTCAGTGTGAGCCAGGATAT	132
<i>Hmbs</i>	BC003861	CTAGTGAGTGTGTTGCACGA	TCACTGTATGCACTGCTACG	112
<i>Nos2</i>	NM_010927	AGAGAGTGCTGTTCCAGGTG	AGCACGCTGAGTACCTCATT	112
<i>Stat6</i>	NM_009284	ATGGTGCCACCTTATGATCT	GCAGTACACTCATGGACTCT	122
<i>Nfkb</i>	AY521463	CTGAGTCCTGCTCCTTCTAA	GCTGCCTGGATCACTTCAAT	125

3.8.2 Extração de RNA

Para a extração de RNA, a exposição de macrófagos J774A.1 foi realizada em placas de 24 poços (KASVI) na concentração de 1×10^5 células/mL. As concentrações de NP TiO₂ selecionadas para essa etapa foram de 1000, 100 e 10 µg/mL no período de exposição de 72 h de acordo com os resultados apresentados no ELISA. Após a exposição dos macrófagos à NP TiO₂, o meio de cultura foi desprezado e os poços foram lavados com 1 mL de tampão PBS 1x. Em seguida, a coleta de células para a extração de RNA foi realizada em *pools* de três amostras biológicas independentes com a adição de 350 µL de TRIzol (Invitrogen) em cada poço. Após a completa homogeneização, os *pools* foram transferidos para microtubos de 1,5 mL e mantido a temperatura ambiente por 10 min para o desprendimento e lise das membranas das células. A seguir, o tubo foi centrifugado a $12.000 \times g$ a 4°C por 10 min e o sobrenadante transferido para um tubo contendo 200 µL de clorofórmio (Synth).

Após agitação em vórtex e incubação durante 3 min a temperatura ambiente, a amostra foi centrifugada a 12.000 x g a 4°C por 15 min. O sobrenadante foi novamente transferido para um tubo contendo 200 µL de clorofórmio, e após agitação em vórtex foi centrifugado a 12.000 x g a 4°C por 15 min. O sobrenadante foi transferido para tubo contendo 500 µL de isopropanol (Synth), agitado em vórtex e incubado por 10 min a temperatura ambiente. Em seguida, o tubo foi centrifugado a 12.000 x g a 4°C por 10 min e o sobrenadante descartado cuidadosamente para não ocorrer desprendimento do precipitado (*pellet*).

Prosseguiu-se com duas lavagens do RNA precipitado em 500 µL de etanol 75% (v/v água), submetido a agitação manual e seguido de centrifugação a 7.500 x g a 4°C por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado seco a temperatura ambiente. Após a evaporação do etanol residual, o RNA foi ressuscitado em 30 µL de água ultrapura (DEPC 0,2 % v/v), suficiente para desfazer todo o precipitado. É importante destacar que o clorofórmio, o isopropanol e o etanol 75% mencionados acima, foram armazenados a -20°C e mantidos em gelo durante o uso.

A concentração em ng/µL dos RNAs totais foi determinada no equipamento *MultiSkan Go* utilizando uma *µDrop Plate* (Thermo Fischer), avaliando-se indicadores de integridade (razão entre absorbâncias A260/A280) e de contaminação das amostras (A260/A230). As amostras de RNAs foram diluídas 1:10 para correta aferição de concentração.

3.8.3 Síntese de cDNA

A síntese dos cDNAs para análise da eficiência de *primers* e avaliação da expressão dos genes *Nos2*, *Stat6* e *Nfkb* em macrófagos foi realizada com o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems). Um total de 2 µg de RNA de cada amostra foram individualmente tratados com DNase I (Cellco) para eliminação de DNA genômico. A reação de tratamento com DNase I ocorreu em termociclador a 37°C por 30 min. Em seguida, adicionou-se 0,5 µL de *primers oligo dTV* (10 pmol/µL) e 4,2 µL de água ultrapura (DEPC 0,2% v/v). Os tubos foram incubados em termociclador a 65°C por 5 min, como condição de hibridização dos *primers*. Ao término da primeira etapa, os tubos foram mantidos em gelo e adicionados 2 µL de *10x RT Buffer*, 1,5 µL de *10x RT Random Primers*, 0,8 µL dNTP Mix (100 mM) e 1 µL de *MultiScribeTM Reverse Transcriptase* (50 U/µL). As reações de transcrição reversa ocorreram em termociclador segundo as condições a seguir: 25°C por 10 min, 37°C (polimerização das fitas) por 120 min e 85°C por 5 min para desnaturação da enzima. Ao final da transcrição reversa, os tubos contendo cDNA foram armazenados em freezer a -20°C.

3.8.4 Cálculo da eficiência dos *primers*

A avaliação de expressão gênica via qRT-PCR requer que exista uma correlação precisa entre a quantidade de fragmentos amplificados em relação a quantidade de fragmentos inicial (KIM, 2001), o que é expresso pelo valor de eficiência da reação. Os valores de eficiência considerados nesse trabalho e aceitos para avaliar a expressão via quantificação relativa estão na faixa de 90 a 110 % (KHRAPKO, 2006). Para o cálculo da eficiência de cada um dos pares de *primers* foi realizada uma diluição seriada (1:5) de uma amostra conhecida de cDNA de macrófagos J774A.1. O 1º ponto da curva foi obtido de uma diluição empírica do cDNA (aproximadamente 2000 ng). Em seguida, cada ponto da diluição seriada foi utilizado para a confecção de uma curva padrão de cDNA para o cálculo e determinação dos parâmetros de eficiência.

As reações de PCR para cálculo da eficiência foram preparadas em placas de 96 poços (Agilent) com os seguintes componentes: 3 µL de um mix de *primer* F/R (100/ 100 ηM), 3 µL de cDNA-curva e 6 µL de *Brilliant III Ultra-Fast qPCR Master Mix* (Agilent). Também foram preparadas reações sem adição de cDNA (*no template control* – NTC) para verificar a ocorrência de contaminações indesejáveis. Após o preparo, a placa foi selada com adesivo e centrifugada a 1500 rpm a 4°C para mistura dos componentes e retirada de bolhas. Todas as reações foram realizadas no sistema de amplificação e detecção de fluorescência *Aria Real-Time PCR System* (Agilent) que forneceu a curva de amplificação e a curva de *Melting*. As condições de temperatura e tempo de amplificação selecionadas no equipamento foram de: 95°C – 3 minutos (Hot Start) e 95°C – 5 s/ 60°C – 10 s (amplificação) com 40 ciclos de amplificação. Para a construção da curva de *Melting* foi realizado um único ciclo de 95°C – 30 s, 65°C-30 s e 95°C – 30 s.

Após a corrida, a curva padrão foi analisada no *software Aria Mx* (v. 1.7 – Agilent) e observados os seguintes parâmetros: R^2 , inclinação da reta, valor de *intercept* e valor de eficiência. O valor de fluorescência de corte (*threshold*) em que foi observado a melhor condição de eficiência foi anotado para ser utilizado posteriormente na análise de expressão gênica. A curva de *Melting* também foi analisada, sendo observada a formação de picos que poderiam indicar a presença de contaminantes de reação e/ou a formação de dímeros de *primers*.

3.8.5 Análise de expressão gênica (qRT-PCR)

Com as condições de reação e eficiência de *primers* padronizados para as amostras de cDNA de macrófagos J774A.1, foi possível realizar a análise de expressão gênica diferencial entre as amostras expostas à NP TiO₂ (1000, 100 e 10 µg/mL) durante o período de 72h. O método de quantificação relativa utilizado foi o comparativo ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) que considera os valores de Ct entre as amostras para comparar o quanto uma amostra é mais ou menos expressa em relação ao seu calibrador (controle sem exposição à NP TiO₂).

Para a análise de expressão, foram preparadas reações em triplicata técnica para os genes *Nos2*, *Stat6* e *Nfkb* e para o gene *Hmbs* que foi utilizado como o gene normalizador. O cDNA foi diluído 5x em água ultrapura HPLC (Sigma-Aldrich) e a concentração de primers utilizada foi de 100 nM. Cada reação foi preparada com 3 µL de um mix de *primer* F/R (100/ 100 nM), 3 µL de cDNA-curva e 6 µL de *Brilliant III Ultra-Fast qPCR Master Mix* (Agilent). Também foram preparadas reações sem adição de cDNA (*no template control* – NTC). As reações foram realizadas no sistema de amplificação e detecção de fluorescência *Aria Real-Time PCR System* (Agilent). As condições de temperatura e tempo de amplificação selecionadas no equipamento foram de: 95°C – 3 minutos (*Hot Start*) e 95°C – 5 s/ 60°C – 10 s (amplificação) com 40 ciclos de amplificação.

Após as corridas, as curvas de amplificação foram analisadas no *software Aria Mx* (v. 1.7 – Agilent) que forneceu os valores calculados de quantificação relativa em relação ao calibrador, além do valor de *Log Fold Change* em relação ao calibrador. Esses valores foram utilizados para a construções dos gráficos e comparação dos níveis de expressão entre as diferentes condições de exposição à NP TiO₂.

3.9 Análise estatística

Os resultados obtidos nos ensaios de citotoxicidade, genotoxicidade, dosagem de citocinas e qRT-PCR foram analisados utilizando o programa *Graph Pad Prism v.7* (2005) (San Diego, Califórnia, USA). Os dados estão representados pela média ± DP, com exceção dos dados de ELISA que estão representados pela média ± EPM. Para todos os dados obtidos, foi aplicado um dos três Testes de Normalidade (Kolmogorov-Smirnov, Shapiro-Wilks ou D'Agostino-Pearson) com base no número amostral de cada grupo analisado. Posteriormente, para os dados paramétricos foi utilizado o teste *One-way ANOVA* (*One-way Analysis of Variance*) e o pós-teste foi realizado pelo método de Bonferroni ou Tukey (*Tukey's Multiple Comparison Test*). Já para os dados não-paramétricos foi utilizado o teste de *Kruskal-Wallis* e o pós-teste foi realizado pelo método de Dunn (*Dunn's Multiple Comparison Test*). O nível de significância adotado para todos os testes foi de 5%, onde $p < 0,05$, $p^{**} < 0,01$ e $p^{***} < 0,001$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização da NP TiO₂

A caracterização físico-química de nanomateriais é o passo inicial e oferece os recursos necessários para avaliar a interação nano biológica e os possíveis efeitos citotóxicos e genotóxicos promovidos após sua exposição a modelos biológicos (*in vitro/ in vivo*). Como exemplo, estudos com nanopartículas de titânio já demonstraram que a partir da determinação de propriedades físico-químicas secundárias, como tamanho e carga dessas partículas, é possível prever quais serão as interações com células, e assim traçar um panorama de sua toxicidade (TAVARES et al., 2014). Além disso, a caracterização físico-química tem direcionado os processos de síntese de forma a produzir nanomateriais com uma maior biocompatibilidade. Destaca-se nesse ponto, que a caracterização da NP TiO₂ em estudo buscou simular as condições de exposição aos cultivos celulares para assim oferecer suporte na compreensão dos resultados apresentados nos ensaios de citotoxicidade e genotoxicidade.

Em relação à funcionalização da NP TiO₂, um dos métodos mais utilizados para a modificação de superfície de nanomateriais é a adição de grupos carboxílicos (-COOH), sobretudo em nanomateriais de carbono (BANERJEE; KAHN; WONG, 2003; PENG et al., 2003). Nanopartículas de titânio que foram funcionalizadas via carboxilação de superfície apresentaram uma maior biocompatibilidade em ensaios *in vitro* e *in vivo*, com redução de toxicidade e de ativação do processo inflamatório (JR et al., 2014). Além disso, modificações de superfície podem alterar propriedades físico-químicas e modularem a interação com os sistemas biológicos, sobretudo em sua resposta citotóxica e genotóxica.

A caracterização secundária da NP TiO₂, realizada em meio de cultura DMEM suplementado com SFB 10%, encontra-se resumida na Tabela 3. As dispersões de NP TiO₂ em meio de cultura apresentaram um tamanho hidrodinâmico médio de 23,7, 29,8 e 87,3 nm respectivamente para as concentrações de 10, 100 e 1000 µg/mL. Os valores para o índice de polidispersividade (PdI) da NP TiO₂, que representa a distribuição de tamanhos da nanopartícula, foram de 0,47, 0,43 e 0,28 respectivamente para as concentrações de 10, 100 e 1000 µg/mL. Assim, sugere-se que quanto maior a concentração de NP TiO₂ em uma dispersão, maior será a probabilidade de interações nanopartícula-nanopartícula ocorrerem, e assim gerarem aglomerados ou agregados que refletem no aumento de seu tamanho hidrodinâmico. Na concentração de 1000 µg/mL a NP TiO₂ apresentou o maior aumento de diâmetro médio entre as concentrações testadas.

Segundo os valores de PdI (Tabela 3) é possível inferir que as dispersões de NP TiO₂ nas concentrações de 10, 100 e 1000 µg/mL não são monodispersas, uma vez que os valores de PdI foram > 0,08 (“Zetasizer Nano Series User Manual”, 2004). De acordo com as curvas de distribuição, também foi possível verificar que uma dispersão de NP TiO₂ possui três populações de nanopartícula com tamanhos distintos e que podem afetar a forma como a NP TiO₂ interage com os modelos biológicos testados.

Tabela 3. Resumo das características físico-químicas da NP TiO₂. O tamanho hidrodinâmico médio e o índice de polidispersividade (PdI) da nanopartícula foram determinados em meio de cultura (DMEM). O potencial-zeta da nanopartícula foi determinado com dispersões preparadas em água Milli-Q. O índice de polidispersividade (PdI) representa a variação e distribuição das medições de tamanho. Todos os dados foram gerados em um *Zetasizer Nano* por meio de três medidas independentes com 100 leituras para cada parâmetro de caracterização físico-químico. Os dados apresentados representam a média ± desvio padrão.

[NP TiO ₂]	Tamanho hidrodinâmico (nm)	Potencial-zeta (mV)	PdI
1000 ug/mL	87,26 ± 6,3	-22,9 ± 0,75	0,28 ± 0,01
100 ug/mL	29,81 ± 1,044	-21,7 ± 5,2	0,43 ± 0,03
10 ug/mL	23,77 ± 0,50	-10,1 ± 4,9	0,47 ± 0,01

A determinação do potencial-zeta (em mV) da NP TiO₂ representa o quanto um sistema coloidal é estável ou não baseado na repulsão e atração de partículas. O potencial-zeta da NP TiO₂ foi determinado em água Milli-Q para as mesmas concentrações citadas anteriormente e variou em função da menor, média e maior concentração de NP TiO₂, com o maior valor mensurado para a concentração de 1000 µg/mL. Segundo o manual do equipamento *Zetasizer Nano*, os valores de potencial-zeta que indicam um sistema estável são os $> + 30$ mV e $> - 30$ mV (‘‘Zetasizer Nano Series User Manual’’, 2004). Dessa forma, a NP TiO₂ não apresenta uma dispersão estável para nenhuma das concentrações testadas em água ultrapura, concordante com os valores de PDI. A NP TiO₂ não foi caracterizada quanto ao potencial-zeta em DMEM, uma vez que a presença de sais e componentes do meio poderiam afetar as medições no equipamento.

Em nanotoxicologia, a carga e o tamanho de nanopartículas são características físico-químicas que interferem na interação nanopartícula e meio biológico e em como as células irão internalizá-las (WULF et al., 2013). Por exemplo, é descrito que nanopartículas carregadas positivamente (catiônicas) interagem mais facilmente com a bicamada lipídica, o que aumenta sua taxa de internalização e promove maior citotoxicidade (NEL et al., 2009; BHATTACHARYA et al., 2011). Portanto, sugere-se que a carga e o tamanho da NP TiO₂ em questão são alterados em função do meio de veiculação (DMEM, RPMI ou água ultrapura), o que será considerado ao analisar os resultados de citotoxicidade e genotoxicidade apresentados posteriormente (itens 4.2 e 4.3).

O tamanho hidrodinâmico da NP TiO₂ após dispersão em meio de cultura suplementado com SFB, resultou em valores de diâmetro que variaram de aproximadamente 2 nm e atingiram até 87 nm, o que pode ser explicado pelo fenômeno de aglomeração e agregação da nanopartícula. Em geral, nanopartículas apresentam uma superfície de contato reativa e capaz de adsorver biomoléculas presentes no meio de cultura, principalmente proteínas, lipídeos e polissacarídeos que interagem diretamente com nanomateriais e formam uma camada de biomoléculas em sua superfície. Esse fenômeno é conhecido como efeito corona ou do inglês, *protein corona* (PC), que é descrito como um dos maiores fatores de interferência e variação nas análises em nanotoxicologia (LIU; TANG; DING, 2020). As nanopartículas são capazes de interagirem com componentes dos meios de veiculação, como os suplementos (SFB) de meios de cultura utilizados em ensaios *in vitro*, fluidos biológicos e assim, agregam-se entre si até atingirem um grau de aglomeração, refletido pelo aumento do tamanho hidrodinâmico, como foi visto pela NP TiO₂.

Dessa forma, é comumente descrita a formação de PC com nanopartículas em fluidos ou meios biológicos, como é o exemplo de uma outra nanopartícula de titânio que apresentou tamanhos que variaram de 30 até 500 nm na presença de soro (GUNNARSSON et al., 2018). Assim, a formação da PC em nanomateriais é descrita como um processo dinâmico, por meio do efeito de Vroman (VROMAN, 1962) e que depende de fatores físico-químicos das nanopartículas. Esse efeito descreve a ocorrência de uma troca de biomoléculas que são adsorvidas às nanopartículas ao longo do tempo de incubação até atingir um estado de equilíbrio. Inicialmente, proteínas muito abundantes nos meios de veiculação são fracamente adsorvidas às nanopartículas e com o tempo são substituídas por proteínas de alta afinidade e menos abundantes. Os principais fatores que interferem na formação da PC são: as características físico-químicas das nanopartículas, a sua química de superfície, a composição dos meios biológicos e o tempo e temperatura de incubação (LIU; TANG; DING, 2020). É descrito que o próprio formato de nanopartículas pode alterar em como a PC é formada, exemplificado pelo estudo que comparou diferentes estruturas de nanopartículas de titânio frente à formação da PC (DENG et al., 2009). Observou-se que nanopartículas esféricas adsorveram mais proteínas em sua superfície em relação a nanopartículas alongadas, uma evidência do quanto à formação da PC é um processo complexo. Ao final de sua formação, uma PC pode ser composta por diferentes camadas de biomoléculas (*hard* e *soft corona*) reunidas ao redor de uma região central, ocupada pela nanopartícula, e que podem influenciar as interações nanopartícula-proteínas e nanopartícula-célula.

Portanto, a PC pode ser definida como o rearranjo de biomoléculas ao redor de nanopartículas, capaz de criar uma identidade biológica para essa unidade (CARUSO et al., 2012; MONOPOLI et al., 2012) e que modifica a sua interação biológica ao ser exposto à células, tecidos e organismos (SHANG; NIENHAUS, 2015; CORBO et al., 2017). Assim, a descrição do funcionamento e composição da PC são abordagens importantes para elucidar os mecanismos de *uptake* celular, biodistribuição e excreção das nanopartículas após sua exposição. Em estudos que avaliam a citotoxicidade de nanopartículas, é visto que a PC é capaz de interferir na citotoxicidade (CORBO et al., 2016), alterar a sua interação com a bicamada lipídica e modificar as respostas imunes (LEE et al., 2014), principalmente relacionado aos processos inflamatórios.

O que torna a PC um tópico interessante de estudo é que proteínas comuns e conhecidas podem ser adsorvidas em nanopartículas e gerarem diferentes padrões de resposta biológica, que irão definir a identidade toxicológica do nanomaterial (YI, 2015). Com isso, todos os passos em nanotoxicologia, desde o preparo, caracterização e condições de exposição de nanopartículas são fatores a serem considerados em uma análise nanotoxicológica, que podem interferir na formação e composição da PC, e conseqüentemente podem alterar a resposta cito ou genotóxica de nanomateriais. Além disso, os *end points* selecionados em função das metodologias disponíveis para avaliar a cito ou genotoxicidade também podem ser fatores que contribuem para a geração de resultados contraditórios e, muitas vezes, que são contestados por conta da interferência das nanopartículas e da PC ao longo das análises em laboratório (ONG et al., 2014). Nesse trabalho, foram considerados todos esses possíveis fatores citados para a compreensão refinada da citotoxicidade e genotoxicidade da NP TiO₂ em condições controladas de cultivo celular e de acordo com os resultados de caracterização apresentados nos itens a seguir.

4.2 Ensaio de citotoxicidade (MTT) em fibroblastos e macrófagos

Um dos *end points* considerados para avaliar a citotoxicidade de nanopartículas é a redução de viabilidade celular e alteração da atividade metabólica das células, aonde no caso do ensaio com MTT é considerado o metabolismo e atividade mitocondrial. Segundo a ISO 10993-5 publicada no ano de 2009, a redução da viabilidade de células em até 30% do seu valor inicial representa um indício de citotoxicidade para o composto, nanopartícula ou material testado (OPTAHA; NORMALISATION, 2015). Com isso, para os resultados obtidos nos ensaios de citotoxicidade com MTT foi utilizado o valor de porcentagem de células viáveis acima de 70% para classificar as concentrações de NP TiO₂ como não-citotóxicas e abaixo de 70% para classificar as concentrações como potencialmente citotóxicas.

O ensaio de citotoxicidade da NP TiO₂ em fibroblastos LA-9 apresentou porcentagem de células metabolicamente ativas maior que 70% para todas as concentrações testadas (2000 - 0,1 µg/mL) durante o período de exposição de 24, 48 e 72 h (Figura 8A, 8B e 8C). Dessa forma, nos períodos de exposição citados anteriormente, nenhuma das concentrações promoveu a redução da viabilidade celular. Adicionalmente, não houve diferença estatística significativa entre os grupos analisados nos períodos de exposição à NP TiO₂ em fibroblastos nos períodos de 24, 48 e 72 h.

Com o objetivo de simular se a exposição prolongada da NP TiO₂ aos fibroblastos reduziria a viabilidade das células à um valor menor que 70%, foi realizado um ensaio adicional no período de exposição de 96 h. Nesse período, foi possível observar a redução significativa em 43% e 46% da viabilidade metabólica, respectivamente, nas concentrações de 2000 e 1000 µg/mL (Figura 8D). Houve diferença estatística significativa entre os valores de porcentagem de viabilidade celular para os grupos de 2000 e 1000 µg/mL de NP TiO₂ em relação ao controle negativo.

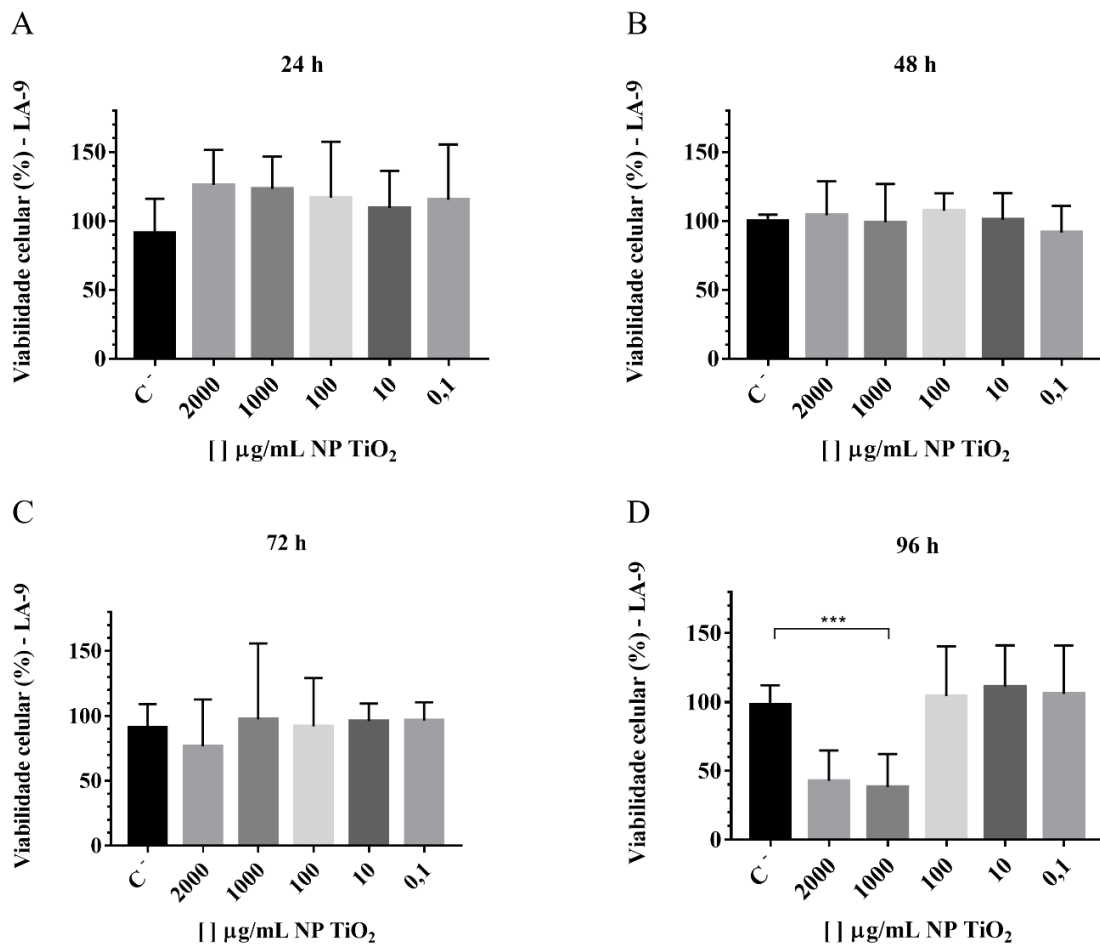


Figura 8. Porcentagem da viabilidade celular de fibroblastos LA-9, utilizando a concentração celular de 3×10^4 células/mL após os períodos de exposição de 24 (A), 48 (B), 72 (C) e 96 h (D) à NP TiO₂. O cálculo foi realizado em relação ao valor da média do grupo C⁻ (células + meio de cultura) que representa 100% de viabilidade celular; Os dados representam a média ± DP de três experimentos independentes; A análise estatística foi realizada pelo teste não-paramétrico *Kruskal-Wallis* e pós-teste de *Dunns*, sendo observada diferença estatística significativa entre os grupo C⁻ em relação aos grupos expostos à NP TiO₂ (1000 e 2000 µg/mL) em (D) sendo $p^{***} < 0,001$.

Em macrófagos J774A.1, o ensaio de citotoxicidade com MTT indicou que a exposição à NP TiO₂ no período de 24 h não promoveu a redução de viabilidade celular para nenhuma das concentrações avaliadas (2000 – 0,1 µg/mL) (Figura 9A). A partir do período de 48 h (Figura 9B), a exposição de macrófagos à NP TiO₂ nas concentrações de 2000 e 1000 µg/mL promoveu a redução significativa da viabilidade celular em relação ao controle negativo. E no período de 72 h (Figura 9C), a exposição dos macrófagos apresentou a maior porcentagem de redução de viabilidade celular para as concentrações de 2000 e 1000 µg/mL, com valores médios de viabilidade respectivamente de 32 e 12% em relação ao controle negativo.

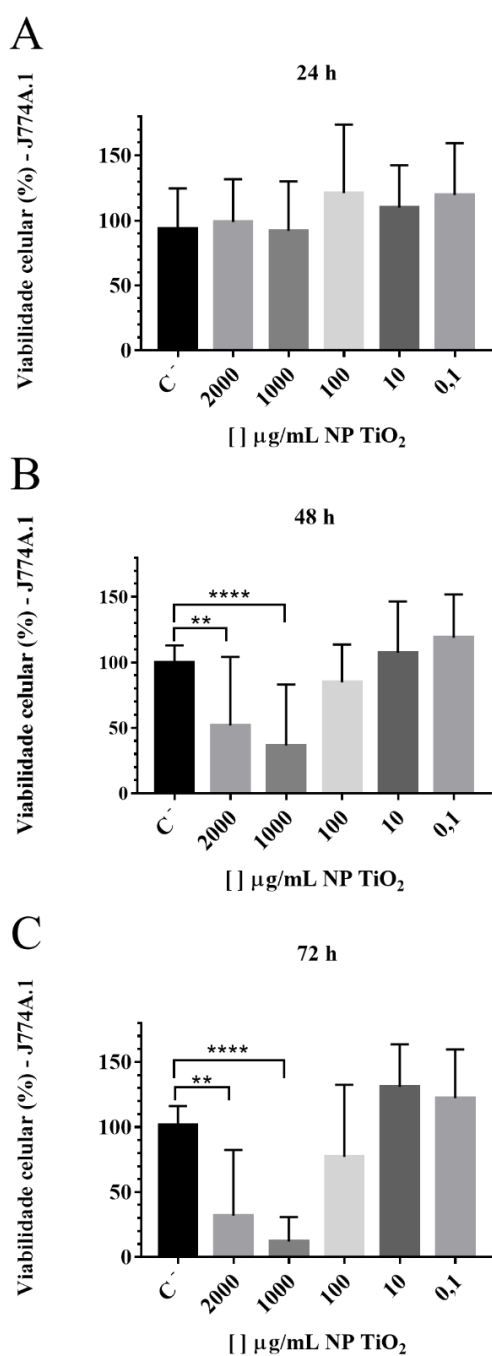


Figura 9. Porcentagem da viabilidade celular de macrófagos J774A.1, utilizando a concentração celular de 5×10^4 células/mL após os períodos de exposição de 24 (A), 48 (B) e 72 h (C) à NP TiO₂. O cálculo foi realizado em relação ao valor da média do grupo C – (células + meio de cultura) que representa 100% de viabilidade celular; Os dados representam a média \pm DP de três experimentos independentes; A análise estatística foi realizada pelo teste não-paramétrico *Kruskal-Wallis* e pós-teste de *Dunns*, sendo observada diferença estatística significativa entre os grupo C em relação aos grupos expostos à NP TiO₂ (2000 e 1000 µg/mL) em (B) e (C) sendo $p^{**} < 0,01$ e $p^{****} < 0,0001$.

Em relação aos resultados apresentados pelo ensaio de citotoxicidade com MTT, observa-se um padrão de resposta para as duas linhagens celulares em que se avaliou os efeitos citotóxicos da NP TiO₂. A redução de viabilidade celular (< 70 %) foi observada para os grupos com as maiores concentrações de nanopartícula (2000 e 1000 µg/mL) e ao longo dos períodos de exposição (48, 72 e 96 h). Assim, é possível relacionar dose, período de exposição e tamanho da nanopartícula como possíveis parâmetros que sugerem um mecanismo de citotoxicidade da NP TiO₂.

Em nanotoxicologia, já existe essa tentativa de relacionar parâmetros de exposição e características físico-químicas como a promoção de citotoxicidade em modelos biológicos, principalmente ao considerar o tamanho e, conseqüentemente, sua superfície de contato, o grau de aglomeração, estrutura cristalina, dispersão do nanomaterial, formato, potencial-zeta e composição química (SHA et al., 2015; ZHANG; LI; YANG, 2015). É descrito que os efeitos citotóxicos das nanopartículas de titânio são dependentes de sua dose e tamanho, sendo que quanto menor uma nanopartícula, mais citotóxica a mesma pode se tornar (KUMAZAWA et al., 2002). Porém, os efeitos citotóxicos da NP TiO₂ foram observados para ambas as linhagens apenas em condições em que o tamanho esperado da nanopartícula foi aumentado, o que refuta a hipótese de que o menor tamanho reflita sempre em um maior potencial citotóxico. Em fibroblastos L929, nanopartículas de titânio promoveram a redução de viabilidade celular a partir do período de exposição de 48 h em diferentes concentrações (6-600 µg/mL), atingindo um valor de viabilidade celular igual a 37 % para a condição em que a nanopartícula apresentou um grau de aglomeração maior (JIN et al., 2008), corroborando nossos dados. Dessa forma, ao sugerir um mecanismo de citotoxicidade de uma nanopartícula devem-se considerar os parâmetros físico-químicos de forma global e correlacioná-los, uma vez que a alteração de um desses parâmetros poderá afetar sua resposta fisiológica e seu perfil de toxicidade (GANGULY; BREEN; PILLAI, 2018).

Para facilitar o entendimento desses parâmetros físico-químicos de forma global, pode-se pensar na definição de nanopartículas como misturas, uma vez que são utilizados diferentes materiais para sua síntese, modificação de superfície, além das alterações que essas partículas podem sofrer em meio biológico (DENG; ZHANG; YU, 2018). É importante considerar também as variações de estruturas cristalinas dentre esses parâmetros, principalmente quando tratamos sobre as nanopartículas de titânio. É descrito que nanopartículas compostas por anatase apresentam uma citotoxicidade cem vezes maior do que aquelas compostas por rutilo (SAYES et al., 2006), explicado por sua elevada atividade fotocatalítica, que é responsável pela geração de EROs. Assim, sugere-se que a composição cristalina da NP TiO₂, que é formada unicamente por anatase, justifique a citotoxicidade observada em altas concentrações de nanopartícula ($\geq 1000 \mu\text{g/mL}$) estudada. É visto que mesmo na ausência de luz, nanopartículas de titânio que são compostas por anatase ainda possuem a capacidade de produzir EROs (SAYES et al., 2006), um fator importante para a ocorrência de citotoxicidade, mesmo em situações controladas como o cultivo celular que ocorre na ausência de luz.

Outro fator que pode modular a citotoxicidade é a presença de ligantes ou modificações de superfície que alteram a carga das nanopartículas e modulam a interação com o ambiente biológico (VON KALM et al., 2013), além de atuar na internalização ou *uptake* das nanopartículas pelas células (JOHNSTON et al., 2009). Segundo o potencial-zeta da NP TiO₂ (item 4.1), é possível sugerir que a nanopartícula apresente uma carga de superfície negativa, justificado também por sua carboxilação de superfície, e que pode ter desacelerado o seu *uptake* celular em fibroblastos. Segundo JR e seus colaboradores (2014), a funcionalização de nanopartículas por meio da carboxilação de superfície é uma das estratégias para a redução de sua citotoxicidade e melhoria em sua biocompatibilidade (JR et al., 2014). Portanto, os resultados de citotoxicidade apresentados estão em concordância com a literatura e com a hipótese de um *uptake* tardio, uma vez que a NP TiO₂ apresentou citotoxicidade apenas em elevadas concentrações ($\geq 1000 \mu\text{g/mL}$) para os fibroblastos em um período de 96 h de exposição. Assim, a hipótese de uma baixa citotoxicidade da NP TiO₂ em função de sua funcionalização, aliada ao reduzido *uptake* celular em fibroblastos, podem ter gerado danos na bicamada lipídica que sinalizaram respostas intracelulares detectadas pelo ensaio de citotoxicidade com MTT apenas no período de 96 h de exposição.

Em comparação com a citotoxicidade da NP TiO₂ em fibroblastos, os macrófagos foram mais suscetíveis aos efeitos citotóxicos, visto que houve redução de viabilidade celular a partir do período de 48 h de exposição (Figura 9B). Assim, a hipótese sugerida para essa observação trata-se da internalização da NP TiO₂ pelos macrófagos via fagocitose, um mecanismo de internalização mais eficiente e que pode ter resultado em efeitos citotóxicos mais severos até o período analisado de 72 h. Macrófagos são fagócitos profissionais e possuem mecanismos de reconhecimento de padrões moleculares em microrganismos e em materiais exógenos via receptores de membrana (GORDON, 2002; BOLLER; FELIX, 2009). Isso permite que regiões do complexo nanopartícula e PC sejam reconhecidas e induzam uma resposta celular. Uma vez no ambiente intracelular, partículas e microrganismos podem promover a ativação dos macrófagos, via mecanismos de defesa (pró-inflamação e autofagia), promover o transporte e ativação do patógeno e até o reconhecimento via opsonização do material exógeno (DERETIC; SAITOH; AKIRA, 2017). Para a NP TiO₂ em questão não é possível sugerir se existe uma via preferencial de ativação intracelular, uma vez que não é entendido até o momento como esse processo ocorre em nanomateriais (GUSTAFSON et al., 2016).

Em concordância com outros estudos que avaliaram a citotoxicidade de nanopartículas de titânio, mesmo em macrófagos, a NP TiO₂ em questão apresentou uma baixa citotoxicidade, uma vez que apenas em concentrações elevadas ($\geq 1000 \mu\text{g/mL}$) houve uma redução significativa de viabilidade celular. Alinhado aos nossos resultados, temos que a nanopartícula de titânio comercial P-25 (Degussa) também apresentou baixa citotoxicidade na linhagem de macrófagos RAW264.7 na concentração de $10 \mu\text{g/mL}$ no período de 24 h, enquanto que outras nanopartículas de óxidos metálicos (prata e zinco) apresentaram maiores efeitos citotóxicos na concentração de $10 \mu\text{g/mL}$ no período de 24 h em comparação ao titânio (GIOVANNI et al., 2015). Outro estudo demonstrou que para todas as catorze nanopartículas de titânio testadas na linhagem humana de macrófagos (THP-1), mesmo na maior concentração testada de $256 \mu\text{g/mL}$, não houveram efeitos citotóxicos no período de exposição de 24 h (BRZICOVA et al., 2019).

Dessa forma, foi observada citotoxicidade apenas em altas concentrações de NP TiO₂ frente às linhagens de fibroblastos e macrófagos. É importante ressaltar que foi esperado que os efeitos citotóxicos da NP TiO₂ fossem diferentes entre as duas linhagens testadas (LA-9 e J774A.1), sendo os macrófagos mais suscetíveis à sua exposição. O que pode explicar essa diferença é devido à citotoxicidade ser célula-dependente (KARLSSON et al., 2008) e a variação de metabolismo existente entre diferentes linhagens celulares (VEVERS; JHA, 2008). Além da baixa citotoxicidade apresentada, outras nanopartículas de titânio avaliadas quanto a sua citotoxicidade também não induziram efeitos citotóxicos em outras linhagens celulares humanas como em linfócitos periféricos (PBL) (HACKENBERG et al., 2011), hepatoma humano HepG2 (EGURA et al., 2011) e células de carcinoma pulmonar humano A549 (JUGAN et al., 2012b). Ao mesmo tempo, outras nanopartículas de titânio já apresentaram potencial citotóxico frente às outras linhagens celulares, como em células bronco-epiteliais humanas BEAS-2B (FALCK et al., 2009), bronco fibroblastos humanos IMR90 (BHATTACHARYA et al., 2009) e em neuroglia de humanos e ratos (MÁRQUEZ-RAMÍREZ et al., 2012), o que reafirma a importância de considerar a citotoxicidade como célula-dependente.

Assim, em combinação com os dados de caracterização, é possível considerar que a NP é não-citotóxica em concentrações menores que 1000 µg/mL nas condições experimentais avaliadas tanto em fibroblastos LA-9 como em macrófagos J774A.1. Porém, destaca-se que os períodos de exposição avaliados são curtos em comparação com o tempo de que trabalhadores e manipuladores podem manter contato com a nanopartícula. No caso da Empresa Petrobras, é indicado que o trabalho em poços de perfuração para extração de petróleo pode durar até 14 dias. Portanto, é necessário complementar os ensaios de citotoxicidade em avaliações de períodos prolongados e que simulem condições de exposição crônica, principalmente devido aos principais mecanismos de citotoxicidade estarem relacionados com a inalação e danos aos pulmões. Em avaliações crônicas, possivelmente as interações de nanopartículas de titânio com os modelos *in vitro*, são capazes de gerar danos celulares refletidos principalmente pela geração de EROs, disfunção mitocondrial, dano ao DNA e apoptose (MELE et al., 2009; GHOSH; BANDYOPADHYAY; MUKHERJEE, 2010).

4.3 Ensaio de Genotoxicidade (Cometa) em fibroblastos LA-9

A avaliação da genotoxicidade por meio do Ensaio Cometa requer o uso de células integras e sem comprometimento de sua viabilidade, o que poderia interferir nos resultados gerados. Portanto, foi necessário que todos os grupos de exposição à NP TiO₂ e grupos controle (negativo e positivo) apresentassem um valor de viabilidade $\geq 70\%$ após o período de cultivo e contato com a nanopartícula para realização do ensaio de genotoxicidade. Segundo o ensaio de citotoxicidade (MTT) foram selecionadas as concentrações de 100, 10 e 1 $\mu\text{g/mL}$ para a análise de danos ao DNA, uma vez que não foram citotóxicas para os fibroblastos LA-9 no período de 24 h. Para esse ensaio não foram selecionadas concentrações maiores que 100 $\mu\text{g/mL}$, pois é visto que nanopartículas podem interferir durante as etapas de eletroforese em lâmina e leitura e cálculo do escore de dano (KARLSSON et al., 2015).

Os valores de viabilidade celular obtidos por meio da contagem de exclusão com azul de Trypan (Tabela 4) corroboraram os resultados do ensaio de citotoxicidade, e apresentaram-se com valores $\geq 90\%$ para todos os grupos de exposição e grupos controle. Dessa forma, assegurou-se a realização correta do Ensaio Cometa para avaliar a genotoxicidade da NP TiO₂.

Tabela 4. Resultados da análise de viabilidade celular em fibroblastos LA-9, após processamento das células para realização do Ensaio Cometa. Os grupos C⁻ e C⁺ representam respectivamente os valores de viabilidade celular para fibroblastos não expostos à NP TiO₂ (células + meio) e fibroblastos expostos à solução de MMS 70 μM .

Grupos	Nº de células Viáveis	Nº de células inviáveis	Viabilidade (%)
100 $\mu\text{g/mL}$ NP TiO ₂	495	5	99
10 $\mu\text{g/mL}$ NP TiO ₂	494	6	98,8
1 $\mu\text{g/mL}$ NP TiO ₂	495	5	99
C ⁻	490	10	98
C ⁺ (MMS)	497	3	99,4

Os resultados de dano primário ao DNA mostraram que a NP TiO₂ foi genotóxica para a linhagem de fibroblastos LA-9 em todas as concentrações avaliadas (100, 10 e 1 µg/mL) no período de 24 h com diferença estatística significativa em relação ao grupo controle negativo (Figura 10). Os valores de escore de dano primário ao DNA induzido pela NP TiO₂ sugerem que a genotoxicidade foi dose-dependente nesse período, com valor maior, intermediário e menor de dano observados, respectivamente, para as concentrações de 100, 10 e 1 µg/mL (Tabela 5). Observou-se, por meio da visualização das cabeças e caudas dos cometas que as classes de dano ao DNA majoritariamente encontradas foram de dano classe 1 e classe 3, com contagens baixas para dano classe 2 em todas as lâminas de grupos que foram expostos à NP TiO₂.

Um ponto importante observado foi que os resultados de genotoxicidade mostraram-se alinhados aos resultados observados pelo ensaio de citotoxicidade com MTT em fibroblastos no período de 24 h (Figura 8A). Ao final desse período, os valores de viabilidade celular para os grupos de exposição de 100, 10 e 0,1 µg/mL foram maiores que os valores para o grupo de células sem exposição à NP TiO₂. Em concordância, essa faixa de concentração de NP TiO₂ apresentou elevado potencial genotóxico no período de 24 h para fibroblastos LA-9, o que pode sugerir a interferência da nanopartícula em regiões do DNA que atuam na regulação do ciclo celular. Observou-se que nanopartículas de titânio interferiram na regulação da proteína PLK1 que participa do processo mitótico, sobretudo no controle da citocinese e na formação do anel contráctil para divisão celular (HUANG et al., 2009). Também é descrita a possível interação de nanopartículas com proteínas que afetam o padrão de ubiquitização de quinases, moléculas-chave da regulação do ciclo celular, o que causariam problemas severos para a manutenção das células (CALZOLAI; FRANCHINI; GILLILAND, 2010). Além da interação direta com biomoléculas e organelas, as nanopartículas de titânio também podem apresentar outros mecanismos primários de genotoxicidade, ativados principalmente pela produção de EROs, com a indução de dano ao DNA e geração de micronúcleo em modelos *in vitro* (SHUKLA et al., 2011, 2013).

Tabela 5. Resultados de escore de dano ao DNA obtidos por meio de Ensaio Cometa após exposição de fibroblastos LA-9 à NP TiO₂ durante o período de 24 h. O Escore de dano ao DNA representa a média de todos os valores de escore calculados para todos os grupos de exposição da NP TiO₂ e para os grupos C⁻ e C⁺ representam a média dos valores respectivamente para fibroblastos não expostos à NP TiO₂ (células + meio) e fibroblastos expostos à solução de MMS 70 μM. ** p < 0,01 e **** p < 0,0001 representam a diferença estatística significativa entre os grupos analisados em relação ao C⁻.

Grupos	Nº de células analisadas	Escore de dano ao DNA
100 μg/mL NP TiO ₂	900	131 ****
10 μg/mL NP TiO ₂	900	114 ****
1 μg/mL NP TiO ₂	900	89 **
C ⁻	1000	60
C ⁺ (MMS)	1000	238 ****

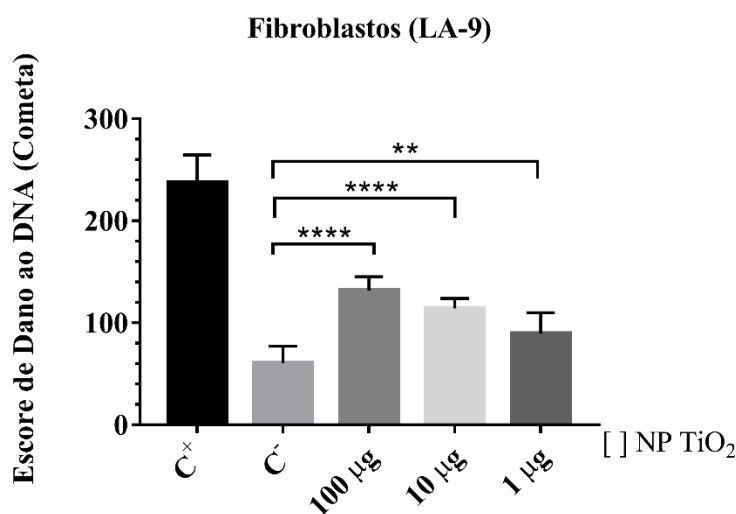


Figura 10. Escore de dano ao DNA induzido após a exposição de fibroblastos LA-9 à NP TiO₂ durante o período de 24 h; C⁻ representa o grupo de células que não foram expostas à NP TiO₂ (controle negativo); C⁺ representa o grupo de células que foram expostas à solução de MMS 70 μM (controle positivo); Os dados representam a média ± DP de dois experimentos independentes; A análise estatística foi realizada pelo teste paramétrico *One-way* ANOVA e pós-teste de Bonferroni, sendo observada diferença estatística significativa entre os grupo C⁻ em relação aos grupos expostos à NP TiO₂ (100, 10 e 1 μg/mL) sendo p ** < 0,01 e p **** < 0,0001.

O período (24 h) em que a genotoxicidade da NP TiO₂ em questão foi avaliada também pode ser um fator de interferência no Ensaio Cometa. Segundo (JUGAN et al., 2012a), os efeitos genotóxicos de duas nanopartículas de titânio (12 e 142 nm) foram reduzidos com o aumento do tempo de exposição (4, 24 e 48 h) quando analisados via Ensaio Cometa. No período de 4 h de exposição, as duas nanopartículas apresentaram uma elevada frequência de danos genotóxicos frente à linhagem A549, porém, ao atingirem o período de exposição de 48 h, a frequência dos danos foi reduzida significativamente. Assim, é visto que quanto menor o período de exposição avaliado, maiores são as frequências de dano primário detectado pelo Ensaio Cometa. O principal fator para essa observação relaciona-se com a incapacidade das células em realizarem o reparo de danos ao DNA em curtos períodos de exposição, além da própria resposta que a célula pode apresentar frente à exposição e o efeito de diluição da nanopartícula (HUK et al., 2014). O mesmo padrão de resposta em relação ao tempo de exposição foi encontrado para outras nanopartículas de titânio que tiveram sua genotoxicidade avaliada pelo Ensaio Cometa, aonde após os períodos de exposição de 48 e 72 h não houve detecção de dano ao DNA significativa em comparação com o período de 24 h (STOCCORO et al., 2016).

O Ensaio Cometa é popularmente empregado em estudos de genotoxicidade de nanopartículas de titânio (DOAK; DUSINSKA, 2017), sobretudo para a avaliação de danos primários ao DNA, abordagem empregada nesse trabalho. Outras versões modificadas do Ensaio Cometa são também descritas para identificar lesões específicas a partir do uso de enzimas de restrição (ex. Endonuclease III) sobretudo relacionadas ao dano oxidativo (MØLLER et al., 2017). Isso justifica a aplicação desse Ensaio, uma vez que os principais fatores relacionados à genotoxicidade de nanomateriais relacionam-se com inflamação e dano oxidativo ao material genético (MØLLER et al., 2010). Dessa forma, como foram observados danos primários ao DNA induzidos pela NP TiO₂ em fibroblastos LA-9 no período de 24 h de exposição, torna-se necessário relacionar e discutir quais características físico-químicas (composição, tamanho e funcionalização de superfície) podem explicar seus efeitos genotóxicos, semelhante ao realizado para a avaliação de citotoxicidade (item 4.2).

É considerado que nanopartículas de titânio de menor diâmetro são internalizadas pelas células mais facilmente, o que foi confirmado por meio da observação do acúmulo desses nanomateriais em compartimentos celulares, como é o caso do núcleo (TOYOOKA; AMANO; IBUKI, 2012). Segundo os dados de caracterização (Tabela 3), é possível sugerir que a NP TiO₂ apresente um tamanho pequeno e próximo à 23 nm nas condições de cultivo e exposição utilizadas no Ensaio Cometa. Dessa forma, mesmo com um *uptake* comprometido em função da carga negativa da NP TiO₂, o tamanho, o baixo grau de aglomeração e a forma cristalina da nanopartícula são fatores que em conjunto podem explicar os elevados efeitos genotóxicos observados no período de 24 h. A forma cristalina é um importante parâmetro físico-químico que altera a genotoxicidade de nanopartículas (CHEN; YAN; LI, 2014), sendo que a anatase apresenta um maior potencial genotóxico em comparação com o rutilo e as formas mistas (anatase/rutilo). Assim, era esperado que efeitos genotóxicos fossem observados para a NP TiO₂, visto que essa é composta unicamente por anatase. Além disso, a funcionalização da nanopartícula não reduziu sua genotoxicidade no período de exposição avaliado. Dessa forma, sugere-se que mesmo com o baixo *uptake* da NP TiO₂ pelos fibroblastos, o que não causou citotoxicidade nesse período, os efeitos genotóxicos foram expressivos devido à estrutura cristalina e pequeno tamanho da nanopartícula.

Em concordância com nossos resultados, outros estudos baseados no Ensaio Cometa também demonstraram que nanopartículas de titânio de menor tamanho ou próximos à 23 nm causaram efeitos genotóxicos em modelos *in vitro*. Segundo (HAMZEH; SUNAHARA, 2013), três tipos diferentes de nanopartículas de titânio, formadas por anatase ou anatase/rutilo, induziram danos ao DNA em uma linhagem de fibroblasto pulmonar de hamster na concentração de 100 mg/mL. Em outro estudo, efeitos genotóxicos de nanopartículas de titânio (< 25 nm) compostas unicamente por anatase foram observados após sua exposição à leucócitos de golfinho nas concentrações de 50 e 100 µg/mL durante 24 e 48 h de exposição (BERNARDESCHI; GUIDI, 2010). Em linhagens humanas, também são descritos efeitos genotóxicos similares das nanopartículas de titânio, principalmente nas linhagens pulmonares A549 e BEAS-2B (BIOLACLIER et al., 2017).

Nesse ponto, destaca-se a importância dos dados de caracterização físico-química obtidos para a NP TiO₂ para auxiliarem na proposição de um mecanismo de cito e genotoxicidade baseado principalmente em danos genotóxicos primários que os fibroblastos sofreram após sua exposição em um período de 24 h.

4.4 Quantificação de IL-10, TNF- α e IL-12 por ensaio imunoenzimático (ELISA) em macrófagos J774A.1

A produção de IL-10, TNF- α e IL-12 em macrófagos foi avaliada após exposição à NP TiO₂ nas quais ao menos uma das concentrações testadas reduziu a viabilidade celular em um dos períodos avaliados no ensaio de citotoxicidade com MTT (1000, 100 e 10 $\mu\text{g/mL}$). Assim, foi comparado o perfil de produção de citocinas e conseqüentemente a indução de resposta inflamatória em macrófagos que tiveram a redução significativa de sua viabilidade, o que pode sugerir a ativação de vias de morte celular.

A citocina IL-10 apresentou um aumento significativo em sua produção no período de 72 h de exposição para as concentrações de 1000 $\mu\text{g/mL}$ em relação à concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ de NP TiO₂ (Figura 11C). Nos períodos de 24 h e 48 h não houve produção significativamente distinta entre as concentrações testadas e em relação ao controle negativo (507 pg/mL - Figura 11A e 11B). Para a citocina TNF- α foi apresentado o aumento de sua dosagem no período de 72 h para as exposições em 1000 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$ de NP TiO₂ (Figura 11F). Porém, os níveis de IL-10 em comparação aos de TNF- α foram elevados, com uma média de produção de 1008 pg/mL ($\pm 175,3$) de IL-10 e 230 pg/mL ($\pm 54,3$) de TNF- α na concentração mais alta de NP TiO₂ em 72 h de exposição (Figura 11). Assim, em concentrações $\geq 1000 \mu\text{g/mL}$ é sugerido que a IL-10 seja secretada como um fator regulatório ao funcionamento dos macrófagos, em concordância com a redução de viabilidade celular demonstrada pelo ensaio de citotoxicidade com MTT (vide Figura 9C).

Em relação à dosagem de IL-12, houve um aumento em sua produção ao longo dos períodos de exposição. Para a concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ em relação à concentração de 100 e 10 $\mu\text{g/mL}$ de NP TiO₂ houve uma diferença significativa em todos os períodos (Figura 12). E houve elevada produção de IL-12 em comparação com a dosagem de IL-10 e TNF- α , com um valor médio de 4768 pg/mL ($\pm 488,7$) produzida para a concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ de NP TiO₂ no período de 72 h (Figura 12C).

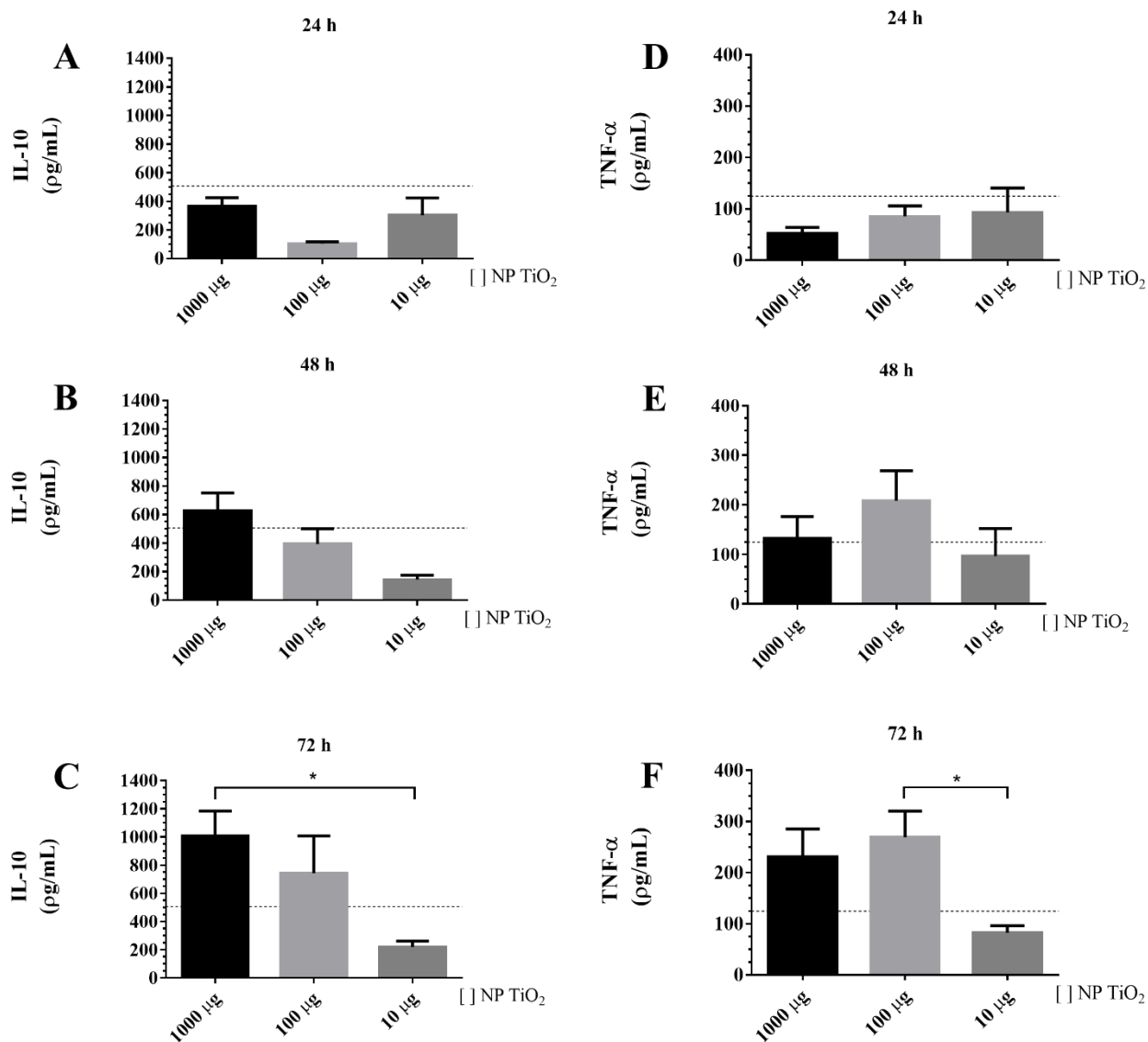


Figura 11. Perfil de produção de citocinas (IL-10 e TNF- α) em $\mu\text{g/mL}$ após exposição de macrófagos J774A.1 à NP TiO₂ nos períodos de 24, 48 e 72 h. A linha em tracejado representa a média global de produção de cada citocina em macrófagos não expostos à NP TiO₂ (controle negativo). Os dados representam a média \pm EPM. A análise foi realizada pelo teste não-paramétrico Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunns, sendo observada diferença estatística significativa entre os grupos analisados sendo $p < 0,05$. Os gráficos representam dados de duas replicatas independentes.

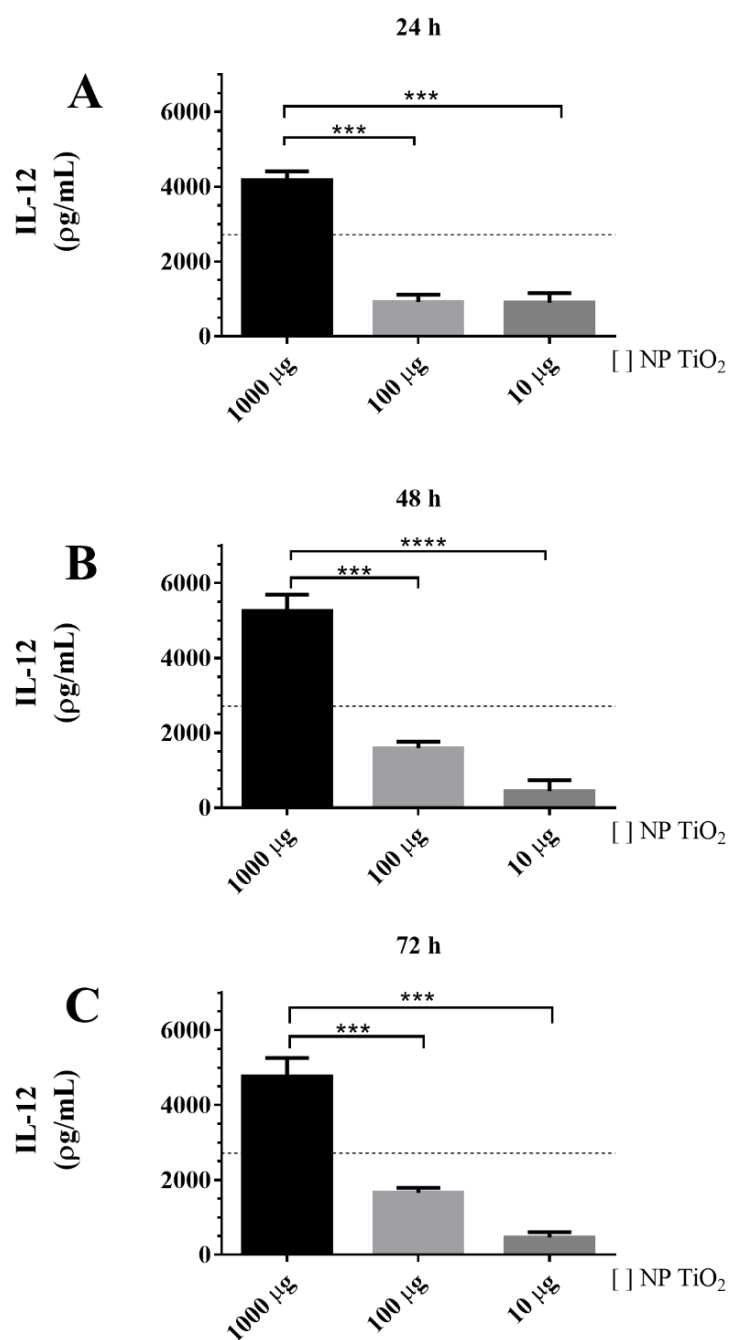


Figura 12. Perfil de produção da citocina IL-12 em $\mu\text{g/mL}$ após exposição de macrófagos J774A.1 à NP TiO₂ nos períodos de 24, 48 e 72 h. A linha em tracejado representa a média global de produção de citocina em macrófagos não expostos à NP TiO₂ (controle negativo). Os dados representam a média \pm EPM. A análise foi realizada pelo teste não-paramétrico *Kruskal-Wallis* e pós-teste de *Dunns*, sendo observada diferença estatística significativa entre os grupos analisados sendo $p < 0,05$ e $p < 0,001$. Os gráficos representam dados de duas replicatas independentes.

Com base no perfil de citocinas produzidas pelos macrófagos após a exposição da NP TiO₂ no período de 72 h, foi sugerida uma hipótese de ativação e promoção de morte celular programada em concordância com a redução de viabilidade celular apresentada no ensaio de citotoxicidade. A produção elevada de IL-12 desde o período de 24 h em 1000 µg/mL de NP TiO₂ é um indicativo do início de uma resposta inflamatória aguda, que atingiu sua produção máxima no período de 72 h (Figura 12). Nesse mesmo período, os níveis de IL-10 produzidos também foram mais elevados, sugerindo uma regulação da imunossupressão da atividade inflamatória e atuação como um fator regulatório para os macrófagos muito ativados. Além disso, é descrita a participação do TNF-α na ativação de vias de promoção da morte celular por apoptose (RATH; AGGARWAL, 1999) ou necroptose via regulação diferencial por c-Jun N-terminal quinases (JNK) (CAO et al., 2018), que em concomitância à alta produção de IL-10 podem explicar a redução de viabilidade vista nessa condição de exposição.

Dessa forma, a internalização da NP TiO₂ por fagocitose ou outras vias de *uptake*, em altas concentrações (≥ 1000 µg/mL) no período de 72 h de exposição pode ter gerado um processo de ativação intracelular nos macrófagos, refletido nos altos níveis de produção de IL-12, e que conduziu para a produção de IL-10 como um fator regulatório (Figura 11 e 12). A citocina IL-10 regula o tamanho das populações de macrófagos, conduzindo para a sua diferenciação ou morte celular (WANG et al., 2001), o que juntamente com o TNF-α pode ter contribuído para a redução de viabilidade celular nesse período. Além disso, os resultados são concordantes com o balanço de IL-10 e IL-12 em macrófagos como um fator essencial para a homeostase celular e manutenção dos processos inflamatórios e anti-inflamatórios/regulatórios (CAO et al., 2019), uma vez que a viabilidade das células foi reduzida.

Por fim, os mecanismos clássicos de ativação dos macrófagos envolvem o reconhecimento de estruturas e moléculas presentes no antígeno, como é o caso, por exemplo, do receptor CD14 responsável pelo reconhecimento de lipopolissacarídeos (LPS) presentes na parede celular de bactérias gram-negativas e que promove o bloqueio de apoptose nos macrófagos (MANGAN et al., 1991). No caso das nanopartículas, determinar um único mecanismo de internalização e ativação dos macrófagos torna-se um desafio, uma vez que as características físico-químicas podem alterar o padrão de reconhecimento por essas células. Um dos exemplos é a participação dos receptores tipo *scavenger* como uma das vias utilizadas para a internalização (KODALI et al., 2014).

4.5 Análise da expressão gênica em macrófagos J774A.1

4.5.1 Extração de RNA

Para a avaliação da expressão gênica de *Nos2*, *Stat6* e *Nfkb* via qRT-PCR, o RNA total de macrófagos J774A.1 foi extraído após a exposição da NP TiO₂ durante o período de 72 h em que houve redução de viabilidade celular e ativação intracelular segundo o ELISA. Cada extração representa o conjunto de RNAs presentes em três amostras biológicas independentes após exposição à NP TiO₂, uma vez que foram preparados *pools* para melhorar a integridade das amostras. Ressalta-se que esse protocolo de extração de RNA foi derivado de um processo de padronização para aplicação em cultivos em placas de 24 poços, e que poderá ser aplicado futuramente em qualquer outro projeto do nosso grupo de trabalho.

Em todas as amostras de RNA, o rendimento (em ng/μL) não foi o ideal, mas suficiente para conduzir a síntese de cDNA. As razões de integridade (A260/A280) e pureza (A260/A230) também indicam que as amostras RNA CN e RNA 10 μg/mL apresentaram os melhores índices. Houve uma dificuldade para alcançar melhores rendimentos e índices de qualidade do RNA com o uso de amostras derivadas de cultura celular, sendo que alguns passos do protocolo de extração foram otimizados para um melhor resultado.

Tabela 6. Quantificação dos RNAs de macrófagos J774A.1 antes do tratamento com DNase e índices de integridade (A260/A280) e contaminação (A260/A230). CN: controle negativo (sem exposição à NP TiO₂).

Amostra	Concentração (ng/μL)	A260/A280	A260/A230
RNA 1000 μg/mL	556,6	1,663	1,0255
RNA 100 μg/mL	467,9	1,737	1,196
RNA 10 μg/mL	258,9	1,838	1,602
RNA CN	356,8	1,963	2,029

4.5.2 Avaliação da expressão dos genes *Nos2*, *Stat6* e *Nfkb* em macrófagos.

A padronização e o cálculo da eficiência dos *primers* para os genes *Hmbs*, *Nos2*, *Stat6* e *Nfkb* estão apresentados na Tabela 7. O cálculo da eficiência de reação para todos os pares de *primers* foi realizado com o valor de *threshold* (ΔR) igual a 130. Os valores de eficiência (%) de reação encontram-se na faixa de 90 a 110% e foram utilizados para a posterior análise de expressão gênica, que considerou a fase exponencial da reação. Os valores dos parâmetros R^2 , *Slope* e *Intercept* também se encontram confiáveis para a análise de expressão gênica.

Tabela 7. Cálculo e parâmetros de Eficiência obtidos para cada par de *primers*.

Gene	Eficiência (%)	R^2	<i>Slope</i>	<i>Intercept</i>
<i>Hmbs</i>	104,89	0,993	-3,21	33,63
<i>Nos2</i>	102,77	0,985	-3,257	36,28
<i>Stat6</i>	102,28	0,993	-3,269	36,58
<i>Nfkb</i>	107,11	0,986	-3,162	32,77

A análise de expressão gênica realizada via qRT-PCR após a exposição de macrófagos J774A.1 à NP TiO₂ durante o período de 72 h indicou que a expressão dos genes *Nos2*, *Stat6* e *Nfkb* foi modulada na presença da nanopartícula (Figura 13). O gene *Nos2* foi mais expresso (*up-regulado*) em relação ao grupo calibrador (controle negativo) em todas as concentrações de NP TiO₂ (1000, 100 e 10 µg/mL). Houve diferença estatística significativa entre todos os grupos analisados (Figura 13A). Em 1000 µg/mL de NP TiO₂ a expressão do gene *Nos2* foi 6 vezes maior em relação ao grupo controle, um dos componentes para a resposta inflamatória nessa condição. Esse achado está de acordo com os resultados de citotoxicidade e dosagem de citocinas, que mostraram a ativação intracelular de macrófagos após a exposição à 1000 µg/mL de NP TiO₂ e a redução de viabilidade celular, o que podem ser explicados em função da elevada expressão do gene *Nos2*. Em 100 e 10 µg/mL, a expressão do gene *Nos2* apresentou-se em níveis mais baixos, o que pode explicar sua baixa citotoxicidade nesse período.

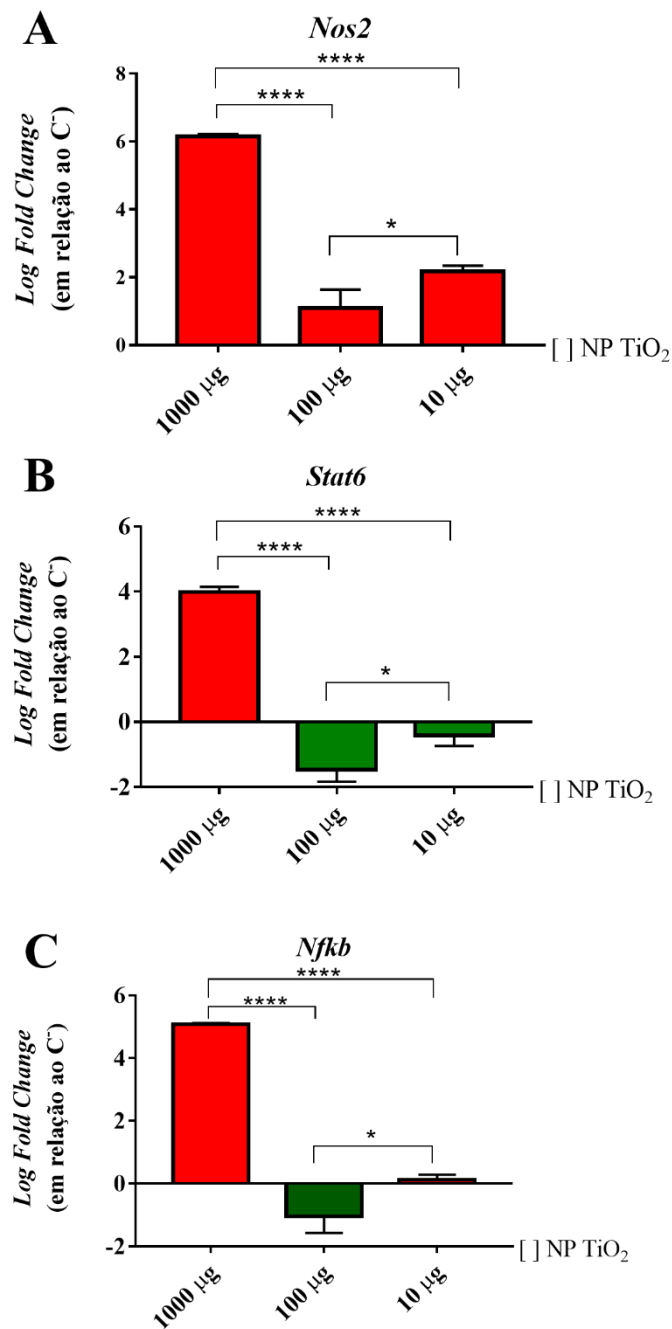


Figura 13. Avaliação da expressão gênica via qRT-PCR dos genes *Nos2* (A), *Stat6* (B) e *Nfkb* (C) em relação ao grupo calibrador (controle negativo). Os dados representam a média \pm DP e foram obtidos após a exposição de macrófagos à NP TiO₂ (1000, 100 e 10 µg/mL) no período de 72 h; em vermelho estão representados os grupos com aumento da expressão gênica (*up*-regulado) em relação ao grupo controle e em verde os que apresentaram redução da expressão gênica (*down*-regulado) em relação ao grupo controle. A análise estatística foi realizada pelo teste paramétrico *One-way* ANOVA e pós-teste de Tukey, sendo observada diferença estatística significativa entre todos os grupos analisados (100, 10 e 1 µg/mL) sendo $p \leq 0,05$ e $p^{****} < 0,0001$.

Avaliar a produção de óxido nítrico (NO) em modelos *in vitro* após exposição a nanopartículas pode fornecer respostas sobre o perfil de ativação intracelular, uma vez que o NO é um agente pró-inflamatório e citotóxico que protege as células frente a agentes patogênicos e extracelulares (YAKOVLEV et al., 2009). O NO também atua em mecanismos de neurotransmissão, função vascular e imuno-regulação (CALABRESE et al., 2007). É produzido durante a conversão da L-arginina em L-citrulina, reação que é catalisada por enzimas da família óxido nítrico sintase (NOS). São descritas três isoformas de NOS, sendo a óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) e óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) enzimas que são cálcio-dependentes e tecido-específicas (ALDERTON; COOPER; KNOWLES, 2001). A terceira isoforma é conhecida como óxido nítrico sintase induzível (iNOS), que atua em doenças cardiovasculares e tem sua produção induzida por estímulos inflamatórios (citocinas, IFN- γ e fatores de crescimento) e padrões de reconhecimento de microrganismos como o LPS (HUNTER, 2002; ITO et al., 2002; LEE et al., 2016). Segundo (BOGDAN, 2001; CAREY et al., 2016), os fagócitos são os maiores efetores contra ação microbiana por meio da produção de NO, o que pode se tornar um *end point* para avaliar a atividade dessas células, como é o caso dos macrófagos.

Assim, a análise de expressão do gene *Nos2* realizada em macrófagos expostos à NP TiO₂ indica que a nanopartícula em condições de exposição ≥ 1000 $\mu\text{g/mL}$ atuou como um estímulo para ativar a transcrição da enzima, observado pelos elevados níveis de expressão gênica em relação ao grupo controle (Figura 13A). É conhecido há anos que o mecanismo de transcrição é o principal ponto de regulação da produção de iNOS, sendo descrita uma região de 1,7 kB presente no promotor do gene *Nos2* de camundongos que é responsiva para citocinas e LPS (LOWENSTEIN et al., 1993; XIE; NATHAN, 1993; DE VERA et al., 1996). A atuação do complexo nanopartícula e PC na ativação intracelular e que resultou nos altos níveis de IL-12 e TNF- α podem sugerir o elevado nível de transcrição de *Nos2*. Isso pode ter resultado em altos níveis de produção de óxido nítrico, uma característica dessa isoforma quando sua expressão gênica é ativada (FORBES et al., 2013), que com ação sinérgica da citocina IL-10 promoveu a indução de vias de morte celular e a redução de viabilidade celular observada via o ensaio de citotoxicidade com MTT (Figura 9C).

É importante ressaltar que a elevada expressão do gene *Nos2* em macrófagos não deve ser associada diretamente com a produção de NO, uma vez que a enzima pode sofrer regulação a nível traducional e modificações no RNA mensageiro que alterem sua correta tradução, modulando, portanto, sua função catalítica. Já existem relatos em literatura acerca da dificuldade e o interesse em associar diretamente níveis de transcrição de RNAs com a produção direta de proteínas (transcriptomas x proteomas) (LAWLESS et al., 2016), aonde o uso de abordagens em proteômica auxiliam na compreensão desse evento (EDFORS et al., 2016).

Uma outra possibilidade para avaliar a produção de NO é por meio de ensaios colorimétricos, como a reação de Griess. Possivelmente isso poderia resolver o impasse científico em relação ao balanço de mRNA e a produção de proteína funcional. Porém, a tentativa de dosagem de NO após exposição aos macrófagos à NP TiO₂ via reação de Griess resultou em falsos positivos (não apresentado), uma vez que a nanopartícula reagiu com os componentes da solução reveladora utilizada. Isso confirma mais uma vez os achados em literatura que descrevem a interferência de nanopartículas em ensaios colorimétricos (GUADAGNINI et al., 2015). Portanto, o uso da qRT-PCR torna-se uma abordagem interessante por evitar a interferência das nanopartículas em resultados, além de fornecer dados que auxiliam na resolução dos mecanismos de citotoxicidade de nanopartículas.

Os genes *Stat6* e *Nfkb* participam da regulação da atividade inflamatória e da polarização em macrófagos (LI; VERMA, 2002; LAWRENCE; NATOLI, 2011), funções que podem ser moduladas após a exposição da NP TiO₂ e que foram investigadas nesse trabalho. O gene *Stat6* foi *up*-regulado na exposição a 1000 µg/mL de NP TiO₂ e menos expresso (*down*-regulado) nas exposições a 100 e 10 µg/mL em relação ao grupo calibrador (Figura 13B). O gene *Nfkb* foi *up*-regulado na exposição de 1000 µg/mL e *down*-regulado na exposição a 100 µg/mL em relação ao grupo calibrador. Para a concentração de 10 µg/mL também foi observada a *up*-regulação do gene *Nfkb*, mas em nível muito baixo em comparação com a maior concentração de NP TiO₂ (Figura 13C). Dessa forma, é possível verificar que os efeitos na expressão dos genes citados foram novamente mais expressivos para a concentração de 1000 µg/mL, o que está alinhado aos resultados apresentados anteriormente. Houve diferença estatística significativa entre todos os grupos analisados (1000, 100 e 10 µg/mL) nos valores de Log *Fold Change* em relação ao calibrador.

A expressão dos genes *Stat6* e *Nfkb* relacionam-se com os achados de dosagem de citocinas após a exposição de macrófagos à NP TiO₂. Para a concentração de 1000 µg/mL de nanopartícula no período de exposição de 72 h, os níveis de IL-10 e IL-12 produzidos por macrófagos foram elevados, o que pode ser explicado pelo aumento da expressão de *Stat6* e *Nfkb*. O fator de transcrição STAT-6 atua na ativação da transcrição do gene para IL-4 via IRF4 (LAWRENCE; NATOLI, 2011) e conduz os macrófagos para um estado de ativação anti-inflamatório e caracterizado pela produção de IL-10. Já o fator NF-kB participa da ativação de vias relacionadas com a atividade pró-inflamatória e na promoção da polarização do tipo M1 (FUJIOKA et al., 2004), o que pode ter resultado na produção significativa de IL-12 nos períodos avaliados.

Segundo a resposta que os macrófagos apresentaram frente à NP TiO₂, é possível sugerir a atuação sinérgica de fatores de transcrição na expressão de citocinas, o que modulou as atividades pró e anti-inflamatórias nessas células, principalmente quando expostas a altas concentrações de nanopartícula. Além disso, os macrófagos são conhecidos por apresentarem assinaturas gênicas referentes aos seus estados clássicos e alternativos de polarização (M1/M2) (GAUTIER et al., 2012), sendo as citocinas e genes avaliados nesse trabalho marcadores que podem diferenciar esses dois estados de ativação. Nossos resultados indicam que ao longo dos períodos de 24, 48 e 72 h os macrófagos que foram expostos à NP TiO₂ alteraram sua resposta por meio da modulação na expressão de fatores de transcrição e, conseqüentemente, na produção de citocinas. A hipótese sugerida é que nos períodos de 24 e 48 h de exposição à NP TiO₂ houve a ativação da via do NF-kB em macrófagos que resultou nos elevados níveis de dosagem para IL-12. Em paralelo, a produção de IL-10 aumentou gradativamente nos períodos até atingir o seu pico máximo no período de 72 h, explicado pela elevada expressão de *Stat6*. Como já sugerido anteriormente, a redução na viabilidade celular observada nessa condição de exposição sugere que a citocina IL-10 atuou como um fator regulatório e que induziu a ativação de vias de morte celular, como exemplo, a via do NF-kB.

Além da *up*-regulação de *Nfkb* sugerir a modulação na produção de citocinas e indução de morte celular, é possível que o fator também participe da ativação da transcrição de *Nos2*. Há muito tempo é descrita a importância do fator NF-kB ao interagir com o promotor do gene *Nos2* de macrófagos de camundongos em condições de estímulo por LPS (LOWENSTEIN et al., 1993; XIE; NATHAN, 1993). Análises por mutação no promotor de *Nos2* demonstraram a presença de regiões de ligação ao NF-kB e que alteram sua interação em função da resposta ao LPS (NATHAN; XIE, 1994). Nossos achados também indicam que, apenas na concentração de 1000 µg/mL, houve aumento na expressão de *Nos2* acompanhada da expressão de *Nfkb*, uma evidência de sua ação sinérgica via citocinas para promover uma elevada produção de iNOS. Em menores concentrações de nanopartícula, a *down*-regulação de *Nfkb* não contribuiu como mais um fator para aumentar a expressão de *Nos2*, o que pode ser observado pelos menores níveis de sua expressão gênica.

Dessa forma, os achados desse tópico reforçam a necessidade de incluir análises moleculares mais refinadas para avaliarmos a toxicidade de nanopartículas. Com os dados de qRT-PCR foi possível tornar a análise mais robusta e interagir os dados de citotoxicidade, produção de citocinas e expressão de fatores de transcrição. Porém, é importante considerar que no ambiente *in vitro* os macrófagos são ativados e sofrem polarização frente a certos estímulos, como citocinas, produtos microbianos, dentre outros (BARTOSH; YLOSTALO, 2014), o que muitas vezes não reflete o real cenário de interação de células com o ambiente de tecidos e órgãos. Isso reforça, portanto, a aplicação de testes *in vivo* e que sejam realizados com base nos achados de ensaios realizados com cultura celular.

5. CONCLUSÃO

A nova NP TiO₂ de interesse industrial foi citotóxica para fibroblastos e macrófagos em elevadas concentrações ($\geq 1000 \mu\text{g/mL}$), genotóxica para fibroblastos em baixas concentrações (100, 10 e 1 $\mu\text{g/mL}$) e modulou a resposta inflamatória de macrófagos.

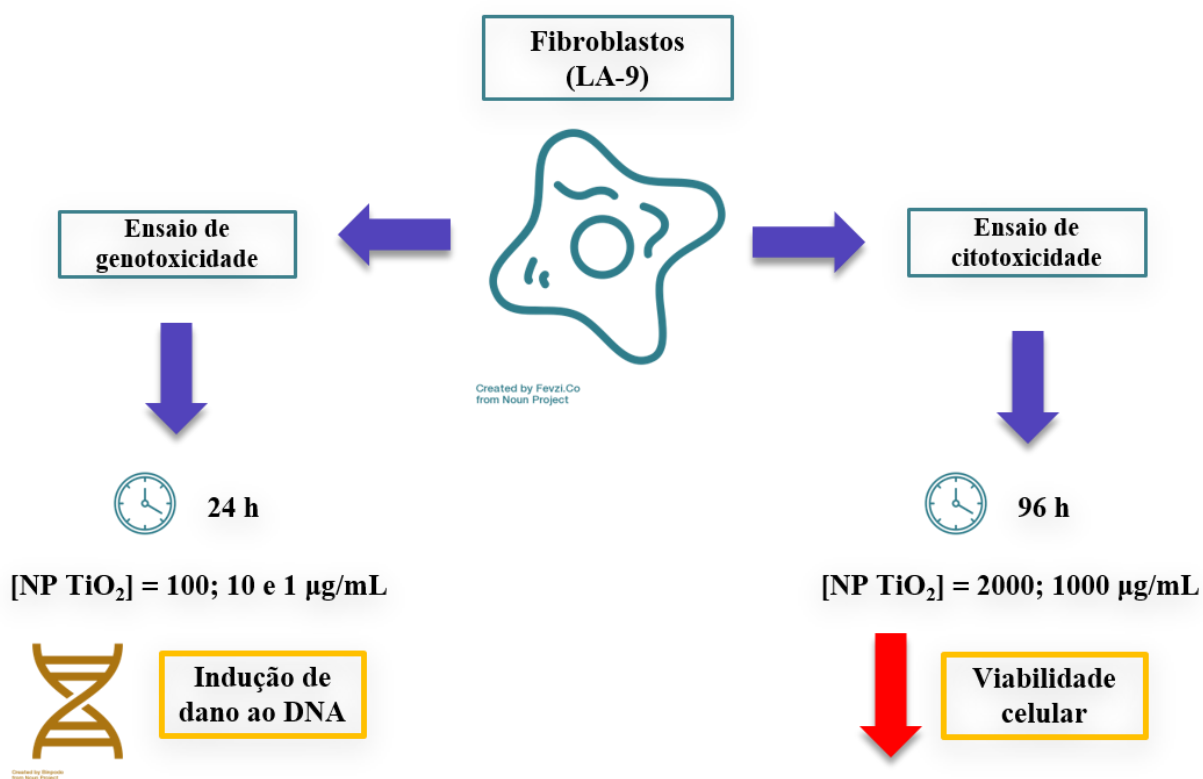


Figura 14. Resumo dos efeitos citotóxicos e genotóxicos em fibroblastos (LA-9) após exposição à NP TiO₂.

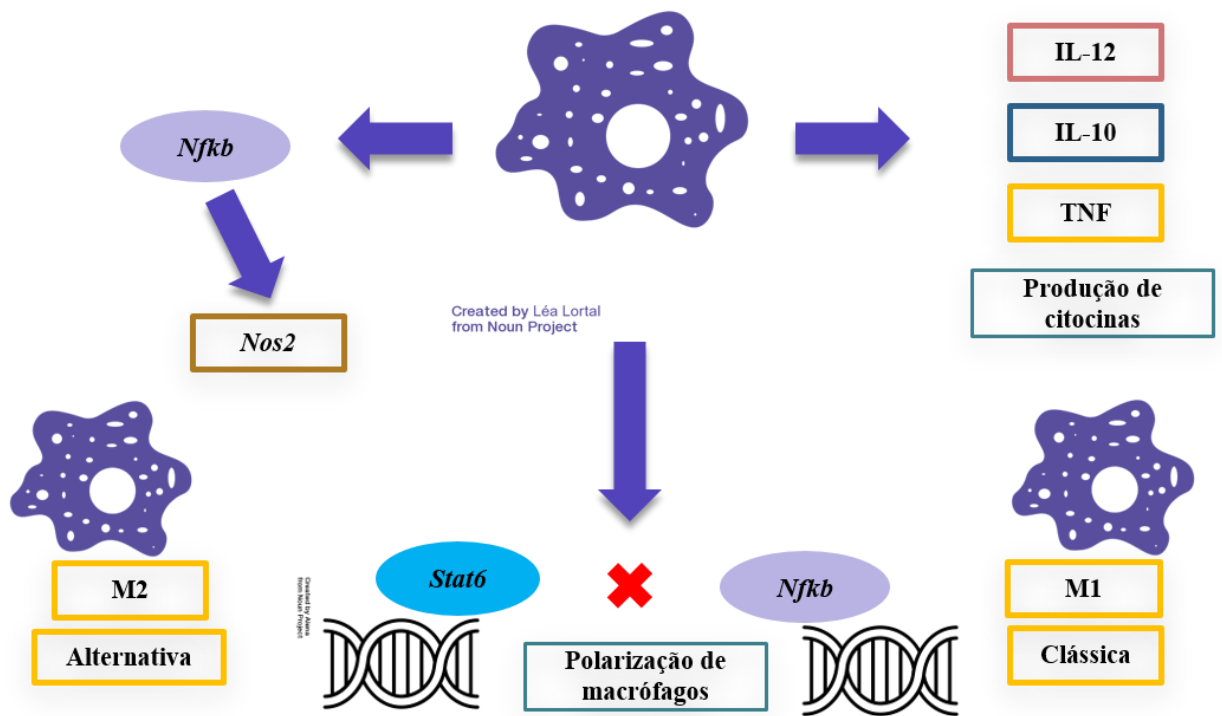


Figura 15. Resumo da modulação da resposta inflamatória em macrófagos (J774A.1) após exposição à NP TiO₂.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALDERTON, W. K.; COOPER, C. E.; KNOWLES, R. G. Nitric oxide synthases: Structure, function and inhibition. **Biochemical Journal**, v. 357, n. 3, p. 593–615, 2001.
- ALLEN, R. The cytotoxic and genotoxic potential of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles on human SH-SY5Y neuronal cells in vitro. **The Plymouth Student Scientist**, v. 9, n. 92, p. 5–28, 2016.
- ARFIN, T.; TARANNUM, A. **Engineered Nanomaterials for Industrial Application : An Overview**. [s.l.] Elsevier Inc., 2018.
- AUFFAN, M. et al. Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective. **Nature Nanotechnology**, v. 4, n. 10, p. 634–641, 2009.
- AZAM, A.; AKHTAR, S. Application of Nanomaterials in Civil Engineering. [s.d.]
- AZQUETA, A.; DUSINSKA, M. The use of the comet assay for the evaluation of the genotoxicity of nanomaterials. v. 6, n. July, p. 1–4, 2015.
- BANERJEE, S.; KAHN, M. G. C.; WONG, S. S. Rational Chemical Strategies for Carbon Nanotube Functionalization. 2003.
- BARTOSH, T.; YLOSTALO, J. Macrophage Inflammatory Assay. **Bio-Protocol**, v. 4, n. 14, 2014.
- BERNARDESCHI, M.; GUIDI, P. Genotoxic potential of TiO₂ on bottlenose dolphin leukocytes. p. 619–623, 2010.
- BHATTACHARYA, R. et al. and beyond. v. 10, n. 7, p. 2543–2548, 2011.
- BIOLA-CLIER, M. et al. Comparison of the DNA damage response in BEAS-2B and A549 cells exposed to titanium dioxide nanoparticles. **Mutagenesis**, v. 32, n. 1, p. 161–172, 2017.
- BLEEKER, E. A. J. et al. Considerations on the EU definition of a nanomaterial: Science to support policy making. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 65, n. 1, p. 119–125, 2013.
- BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response - Nature Immunology. **Nature immunology**, v. 2, n. 10, p. 907–916, 2001.
- BOLAND, S.; HUSSAIN, S.; BAEZA-SQUIBAN, A. Carbon black and titanium dioxide nanoparticles induce distinct molecular mechanisms of toxicity. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 6, n. 6, p. 641–652, 2014.
- BOLLER, T.; FELIX, G. A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors. **Annual Review of Plant Biology**, v. 60, n. 1, p. 379–406, 2009.
- BOVERHOF, D. R. et al. Comparative assessment of nanomaterial definitions and safety evaluation considerations. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 73, n. 1, p. 137–150, 2015.
- BRZICOVA, T. et al. Toxicology in Vitro Nano-TiO₂ stability in medium and size as important factors of toxicity in macrophage-like cells. **Toxicology in Vitro**, v. 54, n. October 2018, p. 178–188, 2019.
- CABUZU, D. et al. Biomedical Applications of Gold Nanoparticles. p. 1605–1613, 2015.
- CALABRESE, V. et al. Nitric oxide in the central nervous system: Neuroprotection versus neurotoxicity. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 8, n. 10, p. 766–775, 2007.
- CALZOLAI, L.; FRANCHINI, F.; GILLILAND, D. Protein - Nanoparticle Interaction : Identification of the Ubiquitin - Gold Nanoparticle Interaction Site. v. 21, n. Figure 1, p. 3101–3105, 2010.

- CAO, M. et al. c-Jun N-terminal kinases differentially regulate TNF- α - and TLRs-mediated necroptosis through their kinase- dependent and -independent activities. **Cell Death and Disease**, 2018.
- CAO, S. et al. Regulation of IL-10 and IL-12 production and function in macrophages and dendritic cells [version 1 ; referees : 3 approved] Referee Status : **Cell Death and Disease**, v. 19, n. 6, p. 1–13, 2019.
- CAREY, R. M. et al. Human upper airway epithelium produces nitric oxide in response to *Staphylococcus epidermidis*. **International Forum of Allergy and Rhinology**, v. 6, n. 12, p. 1238–1244, 2016.
- CARUSO, F. et al. Nanomedicine themed issue. n. 7, 2012.
- CHARACTERIZATION, P.; INTERACTIONS, U. N. Relevance of Physicochemical Characterization of Nanomaterials for Understanding Nano-cellular Interactions. 2018.
- CHEN, T.; YAN, J.; LI, Y. Genotoxicity of titanium dioxide nanoparticles. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 22, n. 1, p. 95–104, 2014.
- CILDIR, G.; LOW, K. C.; TERGAONKAR, V. Noncanonical NF- κ B Signaling in Health and Disease. **Trends in Molecular Medicine**, v. 22, n. 5, p. 414–429, 2016.
- CORBO, C. et al. The impact of nanoparticle protein corona on cytotoxicity, immunotoxicity and target drug delivery. **Nanomedicine**, v. 11, n. 1, p. 81–100, 2016.
- CORBO, C. et al. Biomaterials Science Personalized protein corona on nanoparticles and. 2017.
- DE VERA, M. E. et al. Transcriptional regulation of human inducible nitric oxide synthase (NOS2) gene by cytokines: Initial analysis of the human NOS2 promoter. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 3, p. 1054–1059, 1996.
- DENG, H.; ZHANG, Y.; YU, H. Nanoparticles considered as mixtures for toxicological research. **Journal of Environmental Science and Health - Part C Environmental Carcinogenesis and Ecotoxicology Reviews**, v. 36, n. 1, p. 1–20, 2018.
- DENG, Z. J. et al. Differential plasma protein binding to metal oxide nanoparticles. 2009.
- DERETIC, V.; SAITOH, T.; AKIRA, S. HHS Public Access. v. 13, n. 10, p. 722–737, 2017.
- DOAK, S. H.; DUSINSKA, M. NanoGenotoxicology: present and the future. **Mutagenesis**, v. 32, n. 1, p. 1–4, 2017.
- DUQUE, G. A.; DESCOTEAUX, A. Macrophage cytokines: Involvement in immunity and infectious diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. OCT, p. 1–12, 2014.
- EDFORS, F. et al. Gene-specific correlation of RNA and protein levels in human cells and tissues. p. 1–10, 2016.
- EGURA, B. Ž. et al. DNA damage and alterations in expression of DNA damage responsive genes induced by TiO₂ nanoparticles in human hepatoma HepG2 cells. v. 5, n. September, p. 341–353, 2011.
- EUROPEAN MEDICINES AGENCY. **Quality aspects of Nano-based medicines SME Workshop: Focus on quality for medicines containing chemical entities**. [s.l: s.n.]
- FALCK, G. C. M. et al. Genotoxic effects of nanosized and fine TiO₂. **Human and Experimental Toxicology**, v. 28, n. 6–7, p. 339–352, 2009.
- FERIN, J. et al. Increased pulmonary toxicity of ultrafine particles ? I . Particle clearance , translocation , morphology. n. i, p. 381–384, 1988.
- FORBES, S. P. et al. Modulation of NO and ROS production by AdiNOS transduced vascular cells through supplementation with L-Arg and BH 4 : Implications for gene therapy of restenosis. **Atherosclerosis**, v. 230, n. 1, p. 23–32, 2013.

- FRANKE, M. E. “There is plenty of room at the bottom for innovation”: A report on “Nano2004”, the 7th International Conference on Nanostructured Materials. **Small**, v. 1, n. 1, p. 22–24, 2005.
- FUJIOKA, S. et al. NF- κ B and AP-1 Connection : Mechanism of NF- κ B Dependent Regulation of AP-1 Activity. v. 24, n. 17, p. 7806–7819, 2004.
- GANGULY, P.; BREEN, A.; PILLAI, S. C. Toxicity of Nanomaterials: Exposure, Pathways, Assessment, and Recent Advances. **ACS Biomaterials Science and Engineering**, v. 4, n. 7, p. 2237–2275, 2018.
- GAUTIER, E. L. et al. resource Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. v. 13, n. 11, 2012.
- GHOSH, M.; BANDYOPADHYAY, M.; MUKHERJEE, A. Chemosphere Genotoxicity of titanium dioxide (TiO_2) nanoparticles at two trophic levels : Plant and human lymphocytes. **Chemosphere**, v. 81, n. 10, p. 1253–1262, 2010.
- GIOVANNI, M. et al. Pro-inflammatory responses of RAW264 . 7 macrophages when treated with ultralow concentrations of silver , titanium dioxide , and zinc oxide nanoparticles. **Journal of Hazardous Materials**, v. 297, p. 146–152, 2015.
- GORDON, S. Pattern recognition receptors: Doubling up for the innate immune response. **Cell**, v. 111, n. 7, p. 927–930, 2002.
- GUADAGNINI, R. et al. Toxicity screenings of nanomaterials: Challenges due to interference with assay processes and components of classic in vitro tests. **Nanotoxicology**, v. 9, n. S1, p. 13–24, 2015.
- GUNNARSSON, S. B. et al. Analysis of nanoparticle biomolecule complexes. p. 4246–4257, 2018.
- GUSTAFSON, H. H. et al. Nanoparticle Uptake : The Phagocyte Problem. v. 10, n. 4, p. 487–510, 2016.
- HACKENBERG, S. et al. Nanosized Titanium Dioxide Particles do not Induce DNA Damage in Human Peripheral Blood Lymphocytes. v. 268, n. August 2010, p. 264–268, 2011.
- HAMZEH, M.; SUNAHARA, G. I. Toxicology in Vitro In vitro cytotoxicity and genotoxicity studies of titanium dioxide (TiO_2) nanoparticles in Chinese hamster lung fibroblast cells. **TOXICOLOGY IN VITRO**, v. 27, n. 2, p. 864–873, 2013.
- HE, X.; HWANG, H. ScienceDirect Nanotechnology in food science : Functionality , applicability , and safety assessment. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 24, n. 4, p. 671–681, 2016.
- HENDRANINGRAT, L.; TORSÆTER, O. Metal oxide-based nanoparticles: revealing their potential to enhance oil recovery in different wettability systems. **Applied Nanoscience (Switzerland)**, v. 5, n. 2, p. 181–199, 2015.
- HERINGA, M. B. et al. Risk assessment of titanium dioxide nanoparticles via oral exposure , including toxicokinetic considerations Risk assessment of titanium dioxide nanoparticles via oral exposure , including toxicokinetic considerations. v. 5390, 2016.
- HIRSCH, L. R. et al. Nanoshell-mediated near-infrared thermal therapy of tumors under magnetic resonance guidance. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 23, p. 13549–13554, 2003.
- HUANG, S. et al. Disturbed mitotic progression and genome segregation are involved in cell transformation mediated by nano- TiO_2 long-term exposure. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 241, n. 2, p. 182–194, 2009.
- HUK, A. et al. Is the toxic potential of nanosilver dependent on its size ? p. 1–16, 2014.

- HUNTER, R. P. Nitric oxide, inducible nitric oxide synthase and inflammation in veterinary medicine. **Animal Health Research Reviews**, v. 3, n. 2, p. 119–133, 2002.
- ITO, H. et al. Attenuation of myocardial ischemia / reperfusion injury in rats by thiazolidinedione. **Circulation journal: official journal of the Japanese Circulation Society**, v. 66, p. 622, 2002.
- JIN, C. et al. Cytotoxicity of Titanium Dioxide Nanoparticles in Mouse Fibroblast Cells. p. 1871–1877, 2008.
- JOHNSTON, H. J. et al. Identification of the mechanisms that drive the toxicity of TiO₂ particulates: The contribution of physicochemical characteristics. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 6, 2009.
- JOVANOVI, B.; CVETKOVI, V. J.; MITROVI, T. L. Chemosphere Effects of human food grade titanium dioxide nanoparticle dietary exposure on *Drosophila melanogaster* survival , fecundity , pupation and expression of antioxidant genes. v. 144, p. 43–49, 2016.
- JR, R. F. H. et al. Synthesis , characterization , and bioactivity of carboxylic acid-functionalized titanium dioxide nanobelts. p. 1–15, 2014.
- JUGAN, M. et al. Titanium dioxide nanoparticles exhibit genotoxicity and impair DNA repair activity in A549 cells. v. 6, n. August, p. 501–513, 2012a.
- JUGAN, M. L. et al. Titanium dioxide nanoparticles exhibit genotoxicity and impair DNA repair activity in A549 cells. **Nanotoxicology**, v. 6, n. 5, p. 501–513, 2012b.
- KARLSSON, H. L. et al. Copper Oxide Nanoparticles Are Highly Toxic : A Comparison between Metal Oxide Nanoparticles and Carbon Nanotubes. p. 1726–1732, 2008.
- KE, Y. et al. Human bronchial epithelial cells with integrated SV40 virus T antigen genes retain the ability to undergo squamous differentiation. 1988.
- KHALIL, M. et al. Non-aqueous modification of synthesized hematite nanoparticles with oleic acid. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 453, n. 1, p. 7–12, 2014.
- KHALIL, M. et al. Advanced nanomaterials in oil and gas industry: Design, application and challenges. **Applied Energy**, v. 191, p. 287–310, 2017.
- KHRAPKO, K. PCR troubleshooting. The essential guide. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 6, n. 5, p. 647–647, 2006.
- KIM, D. W. Real time quantitative PCR. **Experimental & molecular medicine**, v. 33, n. 1 Suppl, p. 101–109, 2001.
- KIND, M. et al. Colloid process engineering. **Colloid Process Engineering**, p. 1–398, 2015.
- KODALI, V. et al. NIH Public Access. v. 7, n. 8, p. 6997–7010, 2014.
- KONG, X.; OHADI, M. M. Applications of micro and nano technologies in the oil and gas industry-an overview of the recent progress. **Society of Petroleum Engineers - 14th Abu Dhabi International Petroleum Exhibition and Conference 2010, ADIPEC 2010**, v. 3, p. 1703–1713, 2010.
- KUMAZAWA, R. et al. Effects of Ti ions and particles on neutrophil function and morphology. **Biomaterials**, v. 23, n. 17, p. 3757–3764, 2002.
- LAPPAS, C. M. The immunomodulatory effects of titanium dioxide and silver nanoparticles. **Food and Chemical Toxicology**, v. 85, p. 78–83, 2015.
- LAWLESS, C. et al. Direct and Absolute Quantification of over 1800 Yeast Proteins via Selected Reaction Monitoring * □. p. 1309–1322, 2016.
- LAWRENCE, T.; NATOLI, G. Transcriptional regulation of macrophage polarization: Enabling diversity with identity. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 11, p. 750–761, 2011.

- LEE, J. et al. Altered Nitric Oxide System in Cardiovascular and Renal Diseases. **Chonnam Medical Journal**, v. 52, n. 2, p. 81, 2016.
- LEE, Y. K. et al. Effect of the protein corona on nanoparticles for modulating cytotoxicity and immunotoxicity. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 97–113, 2014.
- LI, Q.; VERMA, I. M. NF- κ B regulation in the immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 10, p. 725–734, 2002.
- LIM, J. et al. TiO₂ Nanostructures in Dietary Supplements Detection and Characterization of SiO₂ and TiO₂ Nanostructures in Dietary Supplements. 2015.
- LIU, N.; TANG, M.; DING, J. Chemosphere The interaction between nanoparticles-protein corona complex and cells and its toxic effect on cells. **Chemosphere**, v. 245, p. 125624, 2020.
- LIU, T. et al. NF- κ B signaling in inflammation. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 2, n. March, 2017.
- LOWENSTEIN, C. J. et al. Macrophage nitric oxide synthase gene: Two upstream regions mediate induction by interferon γ and lipopolysaccharide. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 20, p. 9730–9734, 1993.
- MAEKI, M. et al. Advances in microfluidics for lipid nanoparticles and extracellular vesicles and applications in drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 128, p. 84–100, 2018.
- MAGDOLENOVA, Z. et al. Mechanisms of genotoxicity. A review of in vitro and in vivo studies with engineered nanoparticles. **Nanotoxicology**, v. 8, n. 3, p. 233–278, 2014.
- MAO, H. et al. Hydrophobic associated polymer based silica nanoparticles composite with core-shell structure as a filtrate reducer for drilling fluid at ultra-high temperature. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 129, p. 1–14, 2015.
- MÁRQUEZ-RAMÍREZ, S. G. et al. Titanium dioxide nanoparticles inhibit proliferation and induce morphological changes and apoptosis in glial cells. **Toxicology**, v. 302, n. 2–3, p. 146–156, 2012.
- MEDEIROS, A. M. M. S.; MACHADO, F.; RUBIM, J. C. Synthesis and characterization of a magnetic bio-nanocomposite based on magnetic nanoparticles modified by acrylated fatty acids derived from castor oil. **European Polymer Journal**, v. 71, p. 152–163, 2015.
- MEDZHITOV, R.; HORNG, T. Transcriptional control of the inflammatory response. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, n. 10, p. 692–703, 2009.
- MELE, L. De et al. Response of UMR 106 cells exposed to titanium oxide and aluminum oxide nanoparticles. 2009.
- MITTAL, A. K.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 2, p. 346–356, 2013.
- MØLLER, P. et al. Role of oxidative damage in toxicity of particulates. v. 5762, 2010.
- MØLLER, P. et al. Assessment of evidence for nanosized titanium dioxide-generated DNA strand breaks and oxidatively damaged DNA in cells and animal models. v. 5390, 2017.
- MONOPOLI, M. P. et al. identity of nanosized materials. **Nature Nanotechnology**, v. 7, n. 12, p. 779–786, 2012.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.
- MURTAZA, M.; RAHMAN, M. K.; AL-MAJED, A. A. Mechanical and Microstructural Studies of Nanoclay Based Oil Well Cement Mix under High Pressure and Temperature Application. 2016.

- NAPIERSKA, D. et al. Size-Dependent Cytotoxicity of Monodisperse Silica Nanoparticles in Human Endothelial Cells. n. 7, p. 846–853, 2009.
- NATHAN, C.; XIE, Q. Nitric Oxide Synthases : Roles , Tolls , and Controls. v. 78, n. Table 1, p. 915–918, 1994.
- NEL, A. E. et al. Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface. **Nature Publishing Group**, v. 8, n. 7, p. 543–557, 2009.
- NEOUZE, M. A.; SCHUBERT, U. Surface modification and functionalization of metal and metal oxide nanoparticles by organic ligands. **Monatshefte fur Chemie**, v. 139, n. 3, p. 183–195, 2008.
- OBERDÖRSTER, G. Safety assessment for nanotechnology and nanomedicine: Concepts of nanotoxicology. **Journal of Internal Medicine**, v. 267, n. 1, p. 89–105, 2010.
- ONG, K. J. et al. Widespread nanoparticle-assay interference: Implications for nanotoxicity testing. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, 2014.
- OPTAHA, Y.; NORMALISATION, O. I. D. E. International standard. v. 2009, 2015.
- PANDEY, R. K.; PRAJAPATI, V. K. Molecular and immunological toxic effects of nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 107, n. PartA, p. 1278–1293, 2018.
- PARKIN, I. P.; PALGRAVE, R. G. Self-cleaning coatings. p. 1689–1695, 2005.
- PENG, H. et al. Sidewall Carboxylic Acid Functionalization of Single-Walled Carbon Nanotubes. n. 10, p. 15174–15182, 2003.
- POTOČNIK, J. Commission recommendation of 18 October 2011 on the definition of nanomaterial (2011/696/EU). **Official Journal of the European Union**, v. L275, n. June 2010, p. 38–40, 2011.
- QHOBOSHEANE, M. et al. Biochemically functionalized silica nanoparticles. **Analyst**, v. 126, n. 8, p. 1274–1278, 2001.
- RAI, M. et al. **Nanotechnologies in Food and Agriculture**. [s.l: s.n.]
- RATH, P. C.; AGGARWAL, B. B. TNF- α -Induced Signaling in Apoptosis. v. 19, n. 6, p. 350–364, 1999.
- RHIM, J.; PARK, H.; HA, C. Ac ce pt us t. **Progress in Polymer Science**, 2013.
- RR, T. et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology. **Arch Environ Contam Toxicol**, v. 35, p. 112–122, 2000.
- RSTER, G. O. et al. Increased pulmonary toxicity of ultrafine particles ? Ii . Lung lavage studies. n. 1988, p. 384–387, 1990.
- SAMAT, M. H. et al. Results in Physics Hubbard U calculations on optical properties of 3 d transition metal oxide. **Results in Physics**, v. 6, p. 891–896, 2016.
- SANTRA, A.; BOUL, P. J.; PANG, X. Influence of nanomaterials in oilwell cernent hydration and mechanical properties. **Society of Petroleum Engineers - SPE International Oilfield Nanotechnology Conference 2012**, p. 177–189, 2012.
- SAYES, C. M. et al. Correlating nanoscale titania structure with toxicity: A cytotoxicity and inflammatory response study with human dermal fibroblasts and human lung epithelial cells. **Toxicological Sciences**, v. 92, n. 1, p. 174–185, 2006.
- SCHANEN, B. C. et al. Exposure to titanium dioxide nanomaterials provokes inflammation of an in vitro human immune construct. **ACS Nano**, v. 3, n. 9, p. 2523–2532, 2009.
- SEATON, A. Nanotechnology and the occupational physician. p. 312–316, 2006.
- SERRANO, E.; RUS, G.; GARCÍA-MARTÍNEZ, J. Nanotechnology for sustainable energy. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 13, n. 9, p. 2373–2384, 2009.
- SHA, B. et al. The potential health challenges of TiO₂ nanomaterials. n. March, p. 1086–1101, 2015.

- SHANG, L.; NIENHAUS, G. U. Accepted by **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, 2015.
- SHI, H. et al. Titanium dioxide nanoparticles: A review of current toxicological data. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 10, n. 1, 2013.
- SHI, Z. et al. Enhanced colloidal stability and antibacterial performance of silver nanoparticles/cellulose nanocrystal hybrids. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 3, n. 4, p. 603–611, 2015.
- SHUKLA, R. K. et al. Toxicology in Vitro ROS-mediated genotoxicity induced by titanium dioxide nanoparticles in human epidermal cells. **Toxicology in Vitro**, v. 25, n. 1, p. 231–241, 2011.
- SHUKLA, R. K. et al. TiO₂ nanoparticles induce oxidative DNA damage and apoptosis in human liver cells. v. 7, n. September 2011, p. 48–60, 2013.
- SIMON-DECKERS, A. et al. In vitro investigation of oxide nanoparticle and carbon nanotube toxicity and intracellular accumulation in A549 human pneumocytes. **Toxicology**, v. 253, n. 1–3, p. 137–146, 2008.
- SINGH, N. et al. NanoGenotoxicology: The DNA damaging potential of engineered nanomaterials. **Biomaterials**, v. 30, n. 23–24, p. 3891–3914, 2009.
- SOARES, S. et al. Nanomedicine: Principles, properties, and regulatory issues. **Frontiers in Chemistry**, v. 6, n. AUG, p. 1–15, 2018.
- STEPHENS, A. S.; STEPHENS, S. R.; MORRISON, N. A. Internal control genes for quantitative RT-PCR expression analysis in mouse osteoblasts, osteoclasts and macrophages. **BMC Research Notes**, v. 4, n. 1, p. 410, 2011.
- STOCCORO, A. et al. Original Manuscript A panel of in vitro tests to evaluate genotoxic and morphological neoplastic transformation potential on Balb / 3T3 cells by pristine and remediated titania and zirconia nanoparticles. n. April, p. 511–529, 2016.
- STONE, V.; JOHNSTON, H.; SCHINS, R. P. F. Development of in vitro systems for nanotoxicology: Methodological considerations in vitro methods for nanotoxicology Vicki Stone et al. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 39, n. 7, p. 613–626, 2009.
- SUN, W. et al. Dendrimer-based magnetic iron oxide nanoparticles: their synthesis and biomedical applications. **Drug Discovery Today**, v. 21, n. 12, p. 1873–1885, 2016.
- TAVARES, A. M. et al. Genotoxicity evaluation of nanosized titanium dioxide, synthetic amorphous silica and multi-walled carbon nanotubes in human lymphocytes. **Toxicology in Vitro**, v. 28, n. 1, p. 60–69, 2014.
- THOMASSEN, L. C. J. et al. Synthesis and Characterization of Stable Monodisperse Silica Nanoparticle Sols for in Vitro Cytotoxicity Testing. v. 26, n. 3, p. 328–335, 2010.
- TINKLE, S. et al. Nanomedicines: Addressing the scientific and regulatory gap. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1313, n. 1, p. 35–56, 2014.
- TOYOOKA, T.; AMANO, T.; IBUKI, Y. Mutation Research / Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis Titanium dioxide particles phosphorylate histone H2AX independent of ROS production. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 742, n. 1–2, p. 84–91, 2012.
- TUGAL, D.; LIAO, X.; JAIN, M. K. Transcriptional control of macrophage polarization. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 33, n. 6, p. 1135–1144, 2013.
- VENKATESAN, N. et al. Liquid filled nanoparticles as a drug delivery tool for protein therapeutics. **Biomaterials**, v. 26, n. 34, p. 7154–7163, 2005.
- VEVERS, W. F.; JHA, A. N. Genotoxic and cytotoxic potential of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles on fish cells in vitro. p. 410–420, 2008.

- VON KALM, L. et al. Cellular Interaction and Toxicity Depend on Physicochemical Properties and Surface Modification of Redox-Active Nanomaterials. **ACS Nano**, v. 7, n. 6, p. 4855–4868, 2013.
- WANG, X. et al. Nanoscale metals in Earthgas and mobile forms of metals in overburden in wide-spaced regional exploration for giant deposits in overburden terrains. **Journal of Geochemical Exploration**, v. 58, n. 1 SPEC. ISS., p. 63–72, 1997.
- WANG, Z. et al. Interleukin-10 induces macrophage apoptosis and expression of CD16 (FcγR3) whose engagement blocks the cell death programme and facilitates differentiation. v. 16, 2001.
- WULF, V. et al. The Challenge To Relate the Physicochemical Properties of Colloidal Nanoparticles to Their. v. 46, n. 3, p. 743–749, 2013.
- XIE, Q. W.; NATHAN, C. Promoter of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon-gamma and bacterial lipopolysaccharide. **Transactions of the Association of American Physicians**, v. 106, n. June, p. 1–12, 1993.
- XUE, Y.; WU, J.; SUN, J. Four types of inorganic nanoparticles stimulate the inflammatory reaction in brain microglia and damage neurons in vitro. **Toxicology Letters**, v. 214, n. 2, p. 91–98, 2012.
- YAKOVLEV, V. A. et al. Activation. v. 46, n. 42, p. 11671–11683, 2009.
- YI, D. K. Analyses of protein corona on bare and silica-coated gold nanorods against four mammalian cells. p. 1521–1545, 2015.
- YU, J. et al. Effect of particle hydrophobicity on CO₂ foam generation and foam flow behavior in porous media. **Fuel**, v. 126, p. 104–108, 2014.
- Zetasizer Nano Series User Manual. n. 1, 2004.
- ZHANG, X.; LI, W.; YANG, Z. Toxicology of nanosized titanium dioxide: an update. **Archives of Toxicology**, v. 89, n. 12, p. 2207–2217, 2015.
- INTRODUCTION TO NANOTECHNOLOGY. The size of the Nanoscale. Disponível em <<https://introtonanotechnology.weebly.com/the-nanoscale.html>>