

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS

Priscila Rodrigues de Siqueira

EFEITOS DA EXPOSIÇÃO À NANOPARTÍCULA DE DIÓXIDO DE TITÂNIO EM
HEPATÓCITOS DE PEIXE ZEBRA (*Danio rerio*, Hamilton, 1822). UMA
ABORDAGEM IN VITRO.

São Carlos - SP
2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS

EFEITOS DA EXPOSIÇÃO À NANOPARTÍCULA DE DIÓXIDO DE TITÂNIO EM
HEPATÓCITOS DE PEIXE ZEBRA (*Danio rerio*, Hamilton, 1822). UMA
ABORDAGEM *IN VITRO*.

Orientadora: Dra. Marisa Narciso Fernandes

Dissertação a ser apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ecologia e Recursos Naturais, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ecologia e Recursos Naturais.

São Carlos - SP
2016

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S618e Siqueira, Priscila Rodrigues de
Efeitos da exposição à nanopartícula de dióxido de
titânio em hepatócitos de peixe zebra (*Danio rerio*,
Hamilton, 1822). uma abordagem in vitro / Priscila
Rodrigues de Siqueira. -- São Carlos : UFSCar, 2016.
43 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de
São Carlos, 2016.

1. Viabilidade celular. 2. Mitocôndria. 3.
Lisossomo. 4. Apoptose. 5. Necrose. I. Título.




UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS


Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Priscila Rodrigues de Siqueira, realizada em 27/10/2016:



Prof. Dra. Marisa Narciso Fernandes
UFSCar



Prof. Dra. Rebecka Tomasin
UFSCar



Prof. Dra. Maria Aparecida Marin Morales
UNESP

“As nuvens mudam sempre de posição, mas são sempre nuvens no céu. Assim devemos ser todo dia, mutantes, porém leais com o que pensamos e sonhamos; lembre-se, tudo se desmancha no ar, menos os pensamentos”.

(Paulo Beleki)

Dedico

Ao meu grande amor e companheiro,
Ricardo, pelo amor incondicional e
dedicação sem precedentes.

Agradecimentos

À Profa. Dra. Marisa Narciso Fernandes, por ter sido tão prestativa, paciente e sempre disposta a ajudar. Obrigada por tudo, eu não poderia ter escolhido orientadora melhor.

Ao programa de Pós-graduação em Ecologia e Recursos Naturais (PPG-ERN) da Universidade Federal de São Carlos pelo curso de mestrado. Ao João e à Roseli, secretários do PPG-ERN, por sua disponibilidade e auxílio.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

Ao professor Dr. Valtencir Zucolotto e ao doutorando Fabrício Ap. Santos do Grupo Gnano da Universidade de São Paulo – USP, pelo auxílio com a caracterização das nanopartículas.

À professora Dra. Márcia Regina Cominetti, Ms Amanda Blanque Becceneri, Ms Angelina Maria Fuzer do Laboratório de Biologia do Envelhecimento – Laben pelo auxílio na realização dos ensaios de citometria de fluxo e trypan blue.

À Profa. Dra. Marcela Bianchessi da Cunha Santino, Profa. Dra. Márcia Regina Cominetti e Dra. Jaqueline Pérola de Souza pelas sugestões dadas durante o exame de qualificação.

Ao Dr. Marcelo Gustavo Paulino por toda atenção dispensada, pelo apoio e auxílio.

Ao meu companheiro de todas as horas, Ricardo, que teve enorme paciência comigo durante todo o planejamento, elaboração e execução deste trabalho, mesmo durante as minhas crises de insegurança e ansiedade. Agradeço seu apoio incondicional.

Ao João e à Roseli, secretários do PPG-ERN, pela atenção e disponibilidade e auxílio.

Aos queridos amigos e companheiros de trabalho, Marina, Mariana, Naiara, Iara, Marcelo, Drielle, Marise, Frederico, Priscila, Greyce, Pamela, Edneide, Isabela e Vinícius pelo auxílio e momentos de descontração. Muito obrigada!

SUMÁRIO

1.	Introdução	1
1.1.	Nanomateriais engenheirados	1
1.2.	Nanopartículas de dióxido de titânio (NP-TiO ₂)	4
1.3.	Peixes como biomarcadores ambientais e o papel do peixe zebra como modelo experimental	6
1.4.	Sistemas in vitro e a linhagem celular estabelecida ZF-L	6
1.5.	Testes in vitro como ferramentas de avaliação citotóxica, genotóxica e mutagênica	9
2.	Justificativa	13
3.	Objetivos	13
3.1.	Objetivo Geral	13
3.2.	Objetivos Específicos	13
4.	Materiais e Métodos	14
4.1.	Meios de Cultivo e reagentes químicos	14
4.2.	Linhagem celular ZF-L	14
4.3.	Caracterização e dinâmica das NP-TiO ₂ em suspensão	14
4.4.	Viabilidade Celular	15
4.4.1.	Ensaio de exclusão do corante azul de tripano	15
4.4.2.	Ensaio MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolio)	15
4.4.3.	Ensaio de retenção do corante vermelho neutro	16
4.4.4.	Ensaio de apoptose e necrose em citômetro de fluxo	17
4.5.	Determinação de danos genotóxicos no DNA pelo Ensaio do Cometa	17
4.6.	Determinação de danos mutagênicos no DNA pelo Ensaio do Micronúcleo (MN) com bloqueio da citocinese	18
4.7.	Análises estatísticas	18
5.	Resultados	19
5.1.	Caracterização e dinâmica das NP-TiO ₂ em suspensão	19
5.2.	Viabilidade celular	21
5.3.	Apoptose e necrose	23
5.4.	Genotoxicidade e mutagenicidade	25
6.	Discussão	29
7.	Conclusões	33
	REFERÊNCIAS	34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Comparação dos materiais em nanoescala com outros materiais em microescala. **Disponível em:**

https://www.researchgate.net/publication/224050295_Nanoparticle-mediated_hyperthermia_in_cancer_therapy/figures?lo=1

Figura 2 – Segmentos que utilizam materiais em nanoescala. Extraído de Segala (2009).

Figura 3 – Principais fontes, rotas de exposição e processos de interação dos NMs com organismos vivos e o meio ambiente. **Disponível em:** <https://chem.uiowa.edu/grassian-research-group/impact-manufactured-nanomaterials-metal-and-metal-oxides-the-environment>

Figura 4 – Esquema representativo das formas mais comuns de NP-TiO₂. Rutilo (A); Anatase (B) (Extraído de Brandão, 2008).

Figura 5 – Esquema da utilização de linhagens celulares de peixes como modelos experimentais na ecotoxicologia. Extraído de Cavalcante (2012).

Figura 6 – Células ZF-L em semi-confluência.

Figura 7 – Diferenças entre os processos de apoptose e necrose celular. Extraído de <https://quizlet.com/72197968/cell-injury-adaptation-and-death-flash-cards/>

Figura 8 – Eletromicrografia de NP-TiO₂ em suspensão em água Milli-Q. Barra de escala = 100 nm

Figura 9 – Distribuição e tamanho (nm) dos aglomerados de NP-TiO₂ em diferentes concentrações (0,0; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 25,0; 50,0 e 75,0 µg mL⁻¹), suspensas em RPMI 1640 + Leibovitz L-15 com soro fetal bovino (A) e apenas RPMI 1640 + Leibovitz L-15 (B). A ausência de um controle negativo em b se justifica pela inexistência de partículas.

Figura 10 – A redução do sal MTT com e sem células. Exposição à NP-TiO₂ (0,25 – 1 µg mL⁻¹).

Figura 11 – Viabilidade celular de células ZF-L após a exposição a NP-TiO₂ durante 24 h determinada pelo ensaio de exclusão do corante azul de tripano, ensaio de redução do sal MTT, ensaio de retenção do corante vermelho neutro. Os resultados foram expressos como média ± EP (Azul de tripano), e mediana ± (IQR) (MTT; vermelho neutro). Os asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao CN * p <0,05, ** p <0,005, **** p <0,0001.

Figura 12 – Células ZF-L tratados (B - E) ou não tratados com NP-TiO₂ (A), durante 24 h. As células viáveis são mostradas em Q1-LL. A ocorrência de apoptose inicial (Q1-LR), apoptose final (Q1-UR) e necrose (Q1-UL) foi medida por citometria de fluxo.

Figura 13 – Os danos no DNA foram medidos pelo ensaio do cometa em células ZF-L. Os resultados foram expressos como mediana ± (IQR). Os asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao CN, ** p <0,005, **** p <0,0001.

Figura 14 – Imagens da fragmentação do DNA de células ZF-L. O CN é apresentado em (A); células expostas à NP-TiO₂ (1,0 µg mL⁻¹) por 24 horas (B); células expostas ao CP (1 mM) por 4 horas (C). A barra de escala representa 50 µm.

Figura 15 – Indução de pontes, micronúcleos e brotos após 24 horas de exposição a NP-TiO₂. Os resultados foram expressos como média ± EP (micronúcleos), e mediana ± (IQR) (pontes e brotos). Os asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao CN, * p <0,05, ** p <0,005, **** p <0,0001.

Figura 16 – Aberrações cromossômicas. Ponte nucleoplasmática (seta preta) (A); micronúcleo (seta preta) e uma célula binucleada normal (*) (B); broto e micronúcleo (seta preta) (C). Barras de escalas representam 20 µm (A; C) e 10 µm (B).

RESUMO

Nanopartículas de dióxido de titânio (NP-TiO₂) são comumente usadas em muitos produtos industriais. Por conseguinte, seu consumo diário por seres humanos é estimado em 5,4 mg dia⁻¹, o que acarreta em um aporte no ambiente de 4,2 mg dia⁻¹ por pessoa, podendo ou não receber um tratamento apropriado antes do seu despejo. Foram avaliadas a citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade de NP-TiO₂ para a linhagem permanente derivada de fígado de peixe-zebra (*Danio rerio*) (células ZF-L). Antes da avaliação do potencial tóxico das nanopartículas, foi realizada uma caracterização cuidadosa em meio de cultura com e sem a adição de soro fetal de bovino (SFB). A caracterização em termos do tamanho físico da nanopartícula (NP) foi realizada utilizando um microscópio eletrônico de transmissão (TEM); os tamanhos hidrodinâmicos dos aglomerados e as cargas de superfície foram acessados por medidas de DLS (diameter light scattering) e potencial zeta, respectivamente utilizando um espectrofotômetro. A viabilidade celular foi avaliada por três ensaios diferentes, o ensaio de exclusão do corante azul de tripano (integridade de membrana), ensaio de redução do sal MTT (atividade metabólica mitocondrial) e ensaio de retenção do corante vermelho neutro (viabilidade dos lisossomos). A indução de apoptose e necrose foi avaliada por citometria de fluxo. A genotoxicidade foi determinada pela observação da fragmentação do DNA por meio do ensaio do cometa, enquanto a mutagenicidade foi determinada pelo ensaio de micronúcleos com bloqueio da citocinese. A análise DLS mostrou que o SFB foi eficaz quanto à dispersão das nanopartículas e preveniu a formação de grandes aglomerados, o que permitiu a obtenção de respostas mais robustas relativas à toxicidade real das nanopartículas. Após 24 horas de tratamento, houve ruptura das membranas celulares diminuindo a viabilidade celular a 35,33%, na concentração mais elevada (1,0 µg mL⁻¹). A atividade metabólica mitocondrial manteve-se inalterada, mas foi possível detectar a proliferação dos lisossomos, que foi atribuída principalmente à endocitose das NP. A indução de apoptose foi de 50,4%, e de necrose de 13,9%, ambos na concentração 1,0 µg mL⁻¹ NP-TiO₂. No caso da necrose, um resultado 10 vezes maior do que o apresentado pelo controle negativo. Necrose e apoptose somadas indicaram a diminuição da viabilidade celular a 35,7%. O teste do cometa mostrou a fragmentação do DNA, também foi possível observar a formação de micronúcleos, pontes e brotos demonstrados pelo ensaio do micronúcleo. Em geral, este estudo demonstrou que as

NP-TiO₂, após 24 horas de exposição, afetam significativamente a viabilidade celular e causam danos ao DNA, que podem se tornar irreversíveis. Em conclusão, este estudo mostrou o potencial citotóxico, genotóxicos e mutagênico das NP-TiO₂ para células ZF-L. Respostas mitocondriais e dos lisossomos requerem novos estudos quanto ao efeito das NP-TiO₂ sobre essas organelas.

Palavras chave: viabilidade celular; mitocôndria; lisossomo; apoptose; necrose; micronúcleos.

ABSTRACT

Titanium dioxide nanoparticles (TiO₂-NP) are commonly used in many industrial activities. Consequently, the daily consumption by humans is estimated in 5.4 mg day, with an input in the environment of 4.2 mg day per person, receiving or not appropriated treatment before disposal. The cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity of TiO₂-NP were investigated using the established fish cell line derived from zebrafish (*Danio rerio*) liver (i. e. ZF-L cells). Prior to the evaluation of nanoparticle's toxic potential, a careful characterization was realized in culture medium in the presence or not of fetal bovine serum (FBS). Regarding to the characterization in terms of size was accessed using a transmission electron microscope (TEM), the agglomeration potential and surface charge were accessed by diameter light scattering (DLS) and zeta potential measurements, respectively, using a spectrophotometer. TiO₂-NP in environmentally relevant concentrations were tested for cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity. Cell viability was accessed by four different tests, the trypan blue assay (membrane integrity), MTT reduction assay (mitochondria), neutral red retention assay (lysosomes) and finally, induction of apoptosis and necrosis. Genotoxicity was determined by observing the fragmentation of DNA by the comet assay, while mutagenicity was determined by Cytokinesis-block micronucleus technique. The characterization showed that the FBS was effective in dispersing the nanoparticles and prevent the formation of large agglomerates allowing robust responses on the real toxicity of NP. After 24 hours of treatment, there was cell membranes rupture, decreasing cell viability to 35.33%, at the highest concentration (1.0 µg mL⁻¹). Mitochondrial metabolic activity remained unchanged, but it was possible to detect the proliferation of lysosomes, which was mainly attributed to the NP endocytosis. The induction of apoptosis was 50.4%, and necrosis was 13.9%, both in the concentration 1.0 µg mL⁻¹ TiO₂-NP. In the case of necrosis, a result 10 times greater than that presented by the negative control. Added necrosis and apoptosis indicated a decrease in cell viability to 35.7%. The comet test showed the fragmentation of the DNA, it was also possible to observe the formation of micronuclei, bridges and shoots demonstrated by the micronucleus assay. In general, this study demonstrated that TiO₂-NP, after 24 hours of exposure, significantly affect cell viability and cause DNA damage, which may become irreversible. In conclusion, this study showed the cytotoxic, genotoxic and mutagenic potential of TiO₂-NP for ZF-L cells. Mitochondrial

and lysosome responses require further studies on the effect of TiO₂-NP on these organelles.

Keywords: cell viability; mitochondria; lysosome; apoptosis; necrosis; micronuclei.

1. Introdução

1.1. Nanomateriais engenheirados

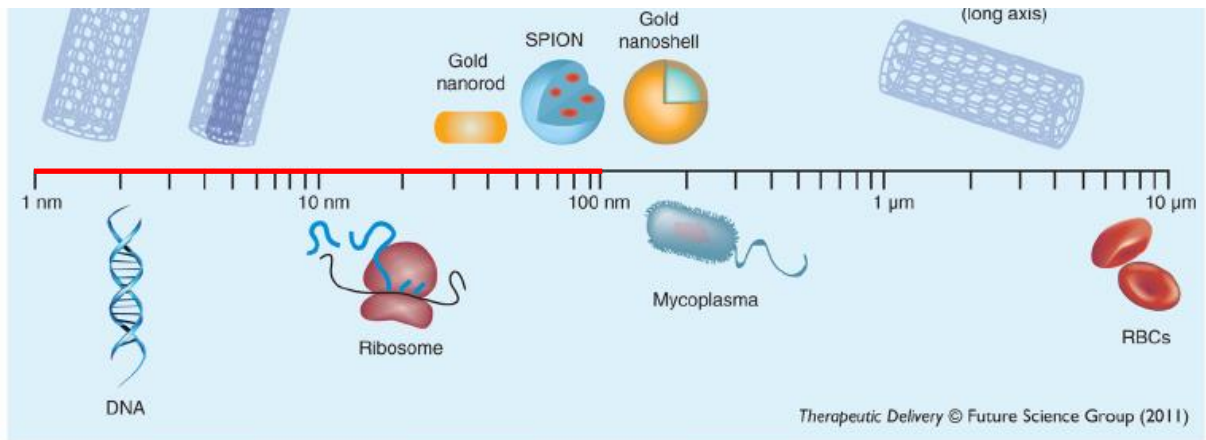
Os nanomateriais (NMs) existem de forma natural provavelmente desde o Big Bang. Contudo, há particular interesse nos nanomateriais engenheirados (NMEs), fabricados para melhorar as características de diversos produtos comerciais (SUTARIYA; PATHAK, 2014).

Richard Feynman, laureado com um prêmio Nobel, foi um dos primeiros a reconhecer o potencial dos materiais em nanoescala para a sociedade industrial. Ele descreveu o processo de manipulação de átomos em nanoescala, tecnologia que em 1974 foi oficialmente denominada de nanotecnologia (SRIVASTAVA; GUSAIN; SHARMA, 2015).

Dentre os NMEs, podemos citar os baseados em carbono, como os fullerenos e nanotubos de carbono: nanotubos de carbono de parede única (SWCNT) ou nanotubos de carbono multicamadas (MWCNT); as nanopartículas inorgânicas à base de óxidos metálicos (TiO_2 , ZnO , Al_2O_3 , Fe_3O_4 , Fe_2O_3 , CeO_2 , etc.), ou metálicas (ouro, prata, alumínio e ferro); os pontos quânticos (sulfeto de cádmio e seleneto de cádmio); os dendrímeros (que são polímeros de tamanho nano construídos a partir de unidades ramificadas que podem ser adaptados para desempenhar funções químicas específicas) e os compósitos, que combinam as nanopartículas (NPs) com outras NPs ou com materiais de dimensões maiores (SRIVASTAVA; GUSAIN; SHARMA, 2015).

O tamanho reduzido (1 a 100 nm) (Fig. 1) confere aos NMs características particulares, como estrutura cristalina, grande área de superfície de contato, capacidade de adsorção, agregação e aglomeração (AUFFAN et al., 2010; PASCHOALINO; MARCONE; JARDIM, 2010). Outras características, por exemplo, capacidade de catálise aumentada e melhor resistência mecânica levaram a um aumento considerável do seu uso em diversos seguimentos industriais (MASCANGIOLI; ZHANG, 2003).

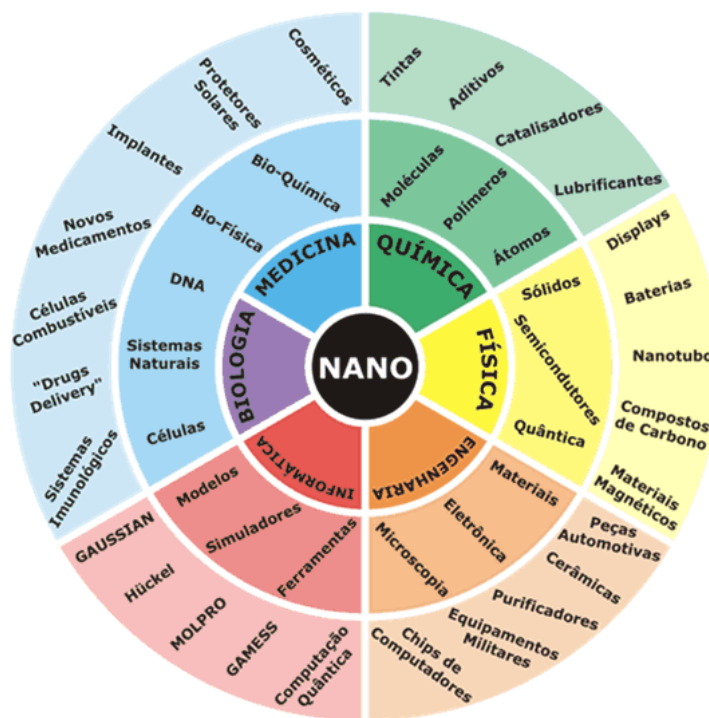
Figura 1 - Escala relativa de nanomateriais sintéticos em comparação com biomacromoléculas e células naturais.



Extraído de Chatterjee *et al.* (2011).

A nanotecnologia é uma ciência multidisciplinar (Fig. 2), que expandiu rapidamente desde os anos 90 (BYSTRZEJEWSKA-PIOTROWSKA; GOLIMOWSKI; URBAN, 2009) e movimentou, globalmente, cerca de US \$1,2 bilhões em 2013, com estimativas de que em 2019 esse valor atinja os US \$4,2 bilhões (BCC Research Nanotechnology Report, 2014).

Figura 2 – Segmentos que utilizam materiais em nanoescala.

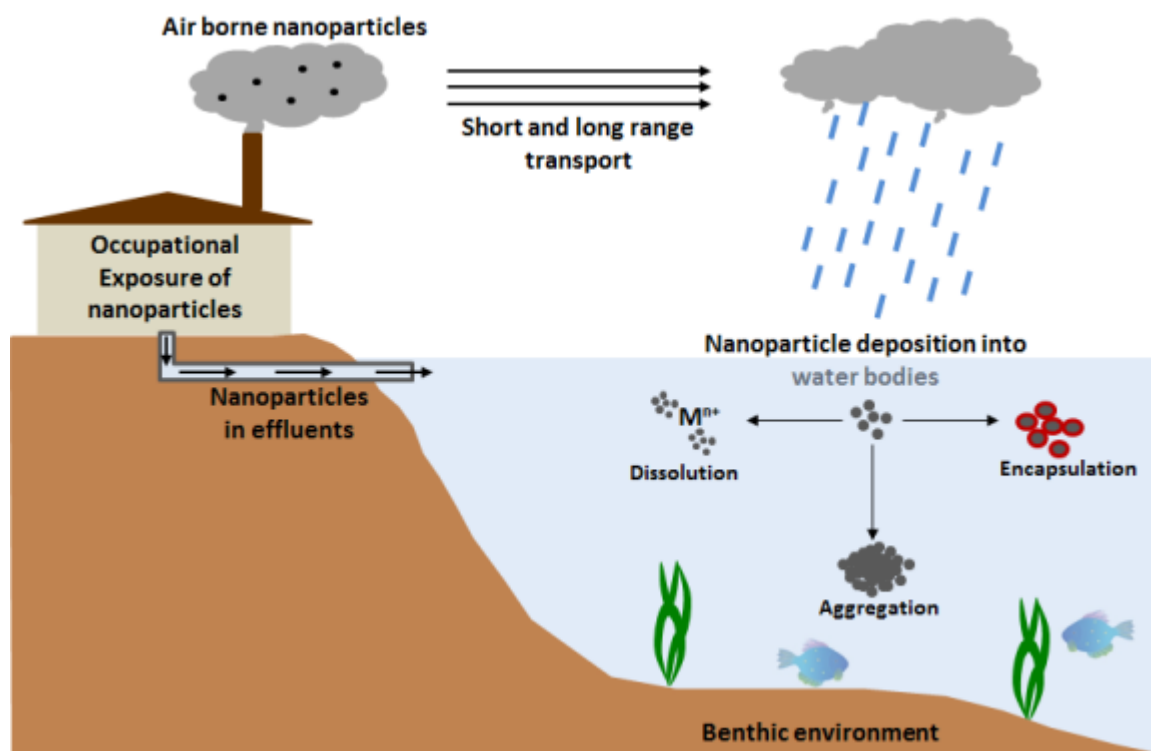


Extraído de Segala (2009).

Estima-se ainda, que entre 2003 e 2004 a produção global de NMEs, considerando somente sua incorporação em protetores solares, tenha sido de aproximadamente 1.000 toneladas, consistindo principalmente de nanopartículas de dióxido de titânio (NP-TiO₂) (PASCHOALINO; MARCONE; JARDIM, 2010). Em 2013, esse consumo de NMEs atingiu a marca de 190.562 toneladas m⁻¹, e deve chegar a 584.984 toneladas m⁻¹ em 2019 (BCC Research Nanotechnology Report, 2014).

Desta forma, se considerarmos que os NMEs estão atualmente presentes em mais de 800 produtos no mercado, podemos concluir que esta é a principal fonte de aporte desses materiais para o meio ambiente (Fig. 3). Contudo, apesar do crescente investimento em nanotecnologia, que impulsiona e movimenta o mercado mundial, ainda são escassos os investimentos em estudos que visam investigar o potencial tóxico desses NMEs, gerando grande preocupação em relação à sua presença no ambiente (AUFFAN *et al.*, 2010; CHATTERJEE, 2008; CHOI *et al.*, 2010; PASCHOALINO; MARCONE; JARDIM, 2010).

Figura 3 – Principais fontes de aporte e interação dos NMs com organismos vivos e o meio ambiente.



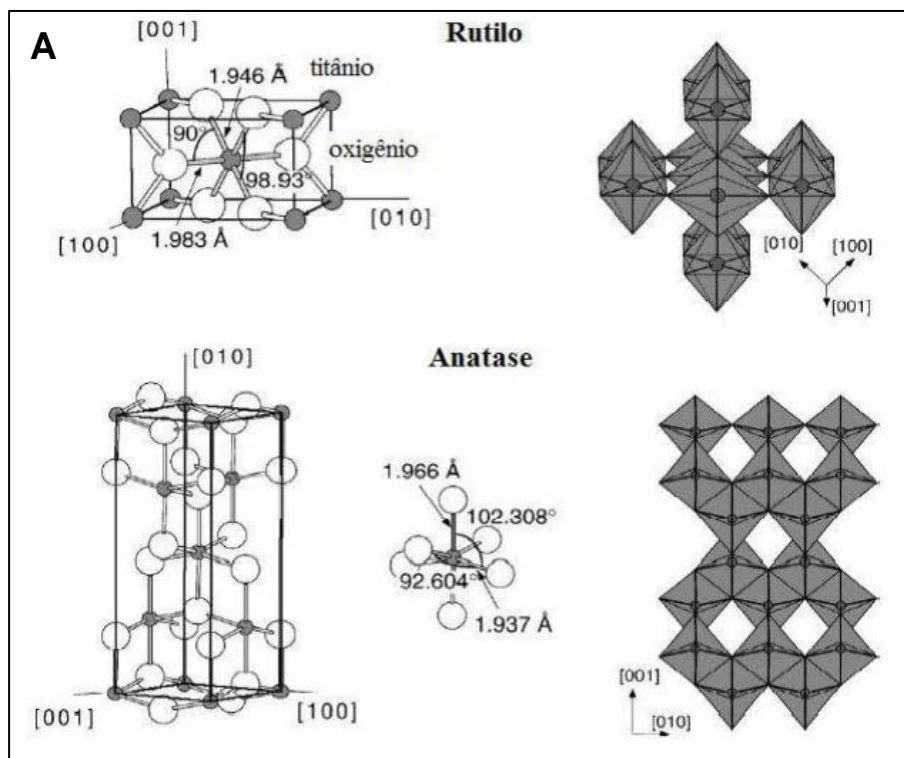
Disponível em: <https://chem.uiowa.edu/grassian-research-group/impact-manufactured-nanomaterials-metal-and-metal-oxides-the-environment>

1.2. Nanopartículas de dióxido de titânio (NP-TiO₂)

O titânio (Ti) é o nono elemento mais abundante na crosta terrestre e, devido à sua grande afinidade para o oxigênio e outros elementos, não existe no estado metálico na natureza. O Ti metálico, o dióxido de titânio (TiO₂), e o tetracloreto de titânio (TiCl₄) são os compostos mais amplamente utilizados na indústria, sendo o TiO₂ o óxido de ocorrência natural. O TiO₂ é um pó branco e inodoro, não combustível, com um peso molecular de 79,9 g /mol, ponto de ebulição 2972 °C, ponto de fusão 1843 °C, e densidade relativa de 4,26 g /cm³ a 25 °C. TiO₂ é um material particulado de difícil solubilização que tem sido amplamente utilizado como pigmento branco (SHI *et al.*, 2013).

O TiO₂ pode ser encontrado em três fases cristalinas diferentes: brookita, anatase e rutilo. Sendo que a fase de brookita é uma fase instável e, por isso, é de muito pouco interesse comercial. A fase rutilo é formada a temperaturas elevadas, enquanto que a fase anatase é formada a baixas temperaturas. Ambas as fases, anatase e rutilo apresentam estrutura cristalina tetragonal (Fig. 4) (CASTAÑEDA *et al.*, 2003; TORRES-TORRES *et al.*, 2010). Alguns estudos sugerem que anatase tem maior potencial tóxico que rutilo por ser mais reativa (PETKOVIĆ *et al.*, 2011; XUE *et al.*, 2010), e que TiO₂ fino (na forma rutilo) é quimicamente inerte, entretanto, NP-TiO₂ são normalmente uma mistura dessas duas formas (SHI *et al.*, 2013).

Figura 4 – Esquema representativo das formas mais comuns de NP-TiO₂. Rutilo (A); Anatase (B).



Extraído de Brandão (2008).

Devido ao seu tamanho diminuto, TiO₂ em nanoescala possui características diferentes comparadas ao TiO₂ fino. Isso ocorre porque uma grande porção de átomos está presente na superfície das NPs, o que lhes confere propriedades de superfície, tais como o nível de energia, estrutura eletrônica, e reatividade bastante diferentes dos estados interiores (SHI *et al.*, 2013). NP-TiO₂ são transparentes à luz visível, altamente absorventes de raios ultravioleta (UV), iridescentes e possuem propriedades fotocatalisadoras (AUFFAN *et al.*, 2010). O seu uso têm sido bastante comum na fabricação de diversos produtos têxteis e eletrônicos, medicamentos, na fotodegradação de poluentes na água (CERRADA *et al.*, 2008; PASCHOALINO; MARCONE; JARDIM, 2010; ZHANG *et al.*, 2007), além de cosméticos e protetores solares (MELQUIADES *et al.*, 2008; SERPONE; DONDI; ALBINI, 2007).

Somente em 2005, a produção de NP-TiO₂ foi de 2.000 toneladas, equivalendo a um investimento de US \$70 milhões. Desta produção, 1.300 toneladas foram empregadas em produtos de cuidados pessoais, como cosméticos e protetores solares. Em 2010, essa produção aumentou para 5.000 ton, e deve continuar

umentando. Estima-se que o consumo de NP-TiO₂ por pessoa em 2012 tenha sido de aproximadamente 5,4 mg dia⁻¹ (KISER *et al.*, 2009; WEIR *et al.*, 2012).

NP-TiO₂ presentes em alimentos, produtos de consumo e de uso doméstico são descarregados no ambiente como fezes, urina ou resíduos de banho ou da limpeza de superfícies. Embora estações de tratamento de águas residuais (ETAR) sejam capazes de remover a maioria dos NMs, cerca de 10-100 µg L⁻¹ ainda permanecem nos efluentes, apresentando partículas de NP-TiO₂ que medem entre 4 e 30 nm. Estes NMs são então liberados em águas de superfície, onde eles podem interagir com os organismos vivos (KISER *et al.*, 2009; WEIR *et al.*, 2012; WESTERHOFF *et al.*, 2011).

1.3. Peixes como biomarcadores ambientais e o papel do peixe zebra como modelo experimental

Os ecossistemas aquáticos estão suscetíveis à entrada de inúmeros poluentes químicos que podem comprometer a biota endêmica, bem como para a homeostase contínua destes ecossistemas (BABICH; BORENFREUND, 1991).

Os peixes representam o maior e mais diversificado grupo de vertebrados, esses organismos são capazes de se adaptar a uma grande variedade de ambientes, ocupam um importante papel na cadeia trófica, mas são sensíveis à contaminação ambiental. Desta forma, são considerados excelentes modelos experimentais em ecotoxicologia (POWERS, 1989; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

O peixe zebra (*Danio rerio*, Hamilton, 1822) tem sido usado em muitos estudos de toxicologia, principalmente por ter um ciclo rápido de reprodução, desenvolvimento precoce, genoma sequenciado e apresentar importante homologia com os mamíferos (aproximadamente 70%) (BARBAZUK, 2000; EIDE *et al.*, 2014). Além disso, atualmente, como alternativa a ensaios *in vivo*, têm sido desenvolvidas técnicas que permitem o cultivo de células de peixe (*in vitro*), reforçando ainda mais o crescente papel do peixe zebra como modelo experimental (BOLS; LEE, 1991).

1.4. Sistemas *in vitro* e a linhagem celular estabelecida ZF-L

A ecotoxicologia é uma ciência interdisciplinar que considera, de forma holística, os processos físico-químicos, fisiológicos, moleculares, toxicológicos e ecológicos.

Além disso, aborda as interações entre as substâncias químicas presentes no ambiente e a biota, focando nos efeitos adversos em diferentes níveis de organização biológica, desde o nível molecular, celular, tecido, órgão e organismo, até populações e ecossistemas. Desta forma, estudar os efeitos de xenobióticos *in vitro* é tão importante quanto estudá-los *in vivo*. Isso porque a interação entre os produtos químicos e a biota ocorre, primariamente, na superfície do organismo ou a nível celular (FENT, 2001).

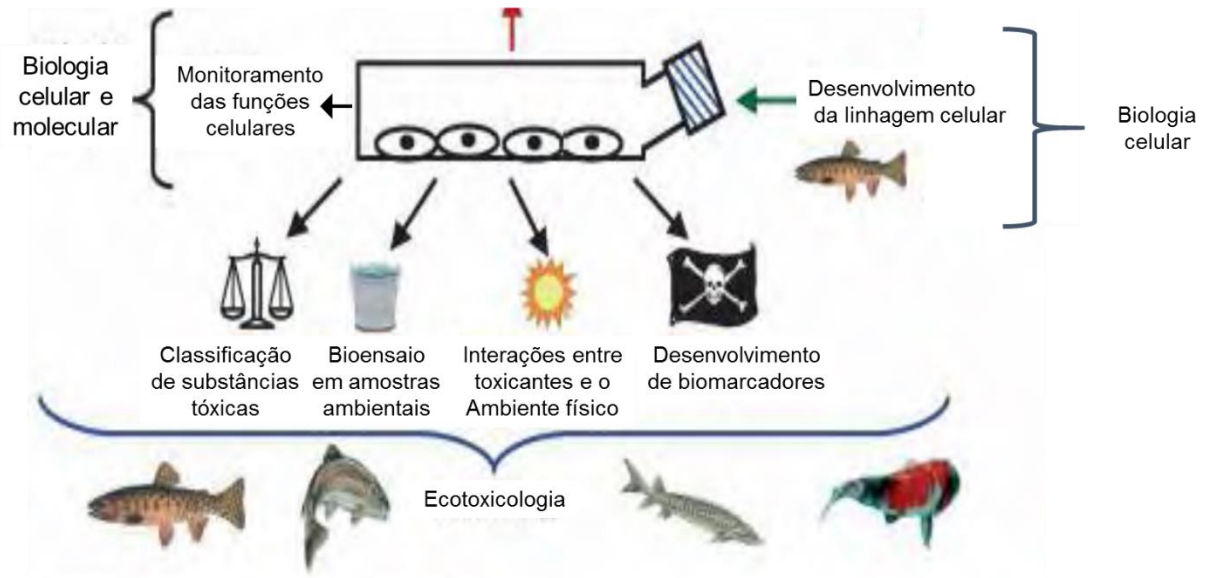
A avaliação das respostas celulares, frente a exposição a um poluente, nos permite detectar precocemente os efeitos da toxicidade, uma vez que alterações celulares podem influenciar no crescimento, desenvolvimento, saúde e, conseqüentemente, na reprodução de indivíduos (FENT, 2001). Sistemas *in vitro* (Fig. 5) desempenham um papel importante em avaliações de toxicidade, pois permitem avaliar os efeitos de poluentes de forma controlada, mais eficiente e com melhor custo-benefício, possibilitando melhorias no delineamento de estudos *in vivo* (ARORA; RAJWADE; PAKNIKAR, 2012; BOLS *et al.*, 2005; FENT, 2007; HUANG; WU; ARONSTAM, 2010).

A linhagem celular estabelecida ZF-L (Fig. 6) é derivada de um grupo de cerca de 10 fígados de peixes adultos da espécie *Danio rerio*, conhecida popularmente como peixe zebra ou paulistinha. Essa linhagem apresenta morfologia típica de células epiteliais, são aderentes e devem ser mantidas a 28 °C com CO₂ atmosférico. Em geral, a duplicação celular ocorre a cada 72 horas, sendo que o seu crescimento é altamente dependente da densidade celular (HE, 2010). Células ZF-L exibem um cariótipo hipodiplóide com número modal de cromossomos de 46 (2n = 50). Células ZF-L também apresentam enzimas de tecido hepático, como a alanina aminotransferase, o aspartato transaminase, a glicose-6-fosfatase e a fosfatase alcalina, além de síntese de albumina sérica (GHOSH; ZHOU; COLLODI, 1994; MIRANDA *et al.*, 1993).

A expressão de níveis enzimáticos de EROD e da dimetilbenzantraceno hidroxilase (DMBA-OH), que são enzimas relacionadas com o citocromo P450, também já foi descrita para essas células. É importante ressaltar que as culturas de células ZF-L continuam a exibir propriedades características de células do parênquima hepático, mesmo após 100 gerações, tornando-as excelentes modelos experimentais

para estudos de metabolismo e formação de metabólitos em células de fígado (GHOSH; ZHOU; COLLODI, 1994; MIRANDA *et al.*, 1993).

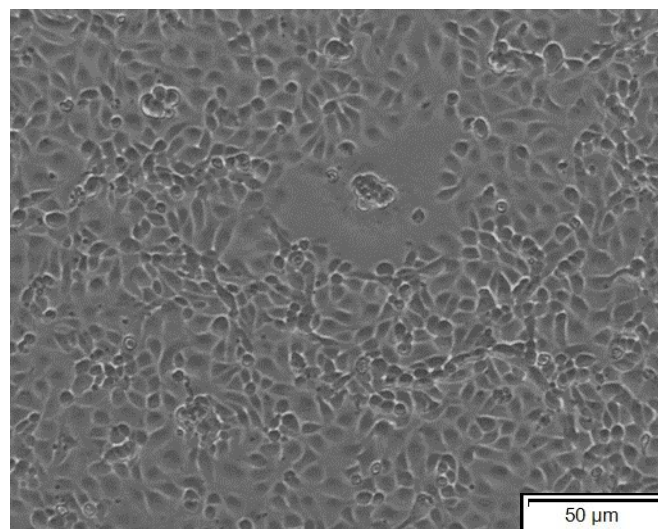
Figura 5 – Esquema da utilização de linhagens celulares de peixes como modelos experimentais na ecotoxicologia.



4 linhagens celulares de peixe como pilares no uso em toxicologia ambiental

Extraído de Cavalcante (2012)

Figura 6 – Células ZF-L em confluência. Aumento de 400x.



1.5. Testes *in vitro* como ferramentas de avaliação citotóxica, genotóxica e mutagênica

O ensaio de exclusão do corante azul de tripano é um teste de citotoxicidade utilizado para determinar o número de células viáveis presentes em uma suspensão celular. Baseado neste ensaio, as células cujas membranas estão intactas excluem o corante azul de tripano. Esta é uma técnica de medição simples e rápida, contudo, é considerada subjetiva, pois é determinada indiretamente pela integridade da membrana celular. Isso porque células inviáveis podem apresentar membranas intactas, ou ainda, células viáveis podem apresentar rupturas nas membranas. Entretanto, rupturas nas membranas podem ser de reparadas, e as células podem tornar-se novamente viáveis. Além disso, pequenas quantidades de absorção do corante podem passar despercebidas (STROBER, 2001).

O ensaio MTT é um ensaio colorimétrico que avalia a viabilidade celular em estudos de proliferação e citotoxicidade. Este ensaio baseia-se na redução do sal de tetrazólio (de cor amarela) em cristais de formazano (um composto de cor roxa). A absorbância obtida é diretamente proporcional à capacidade metabólica das mitocôndrias, e serve como indicativo da quantidade destas organelas presentes na amostra (SYLVESTER, 2011).

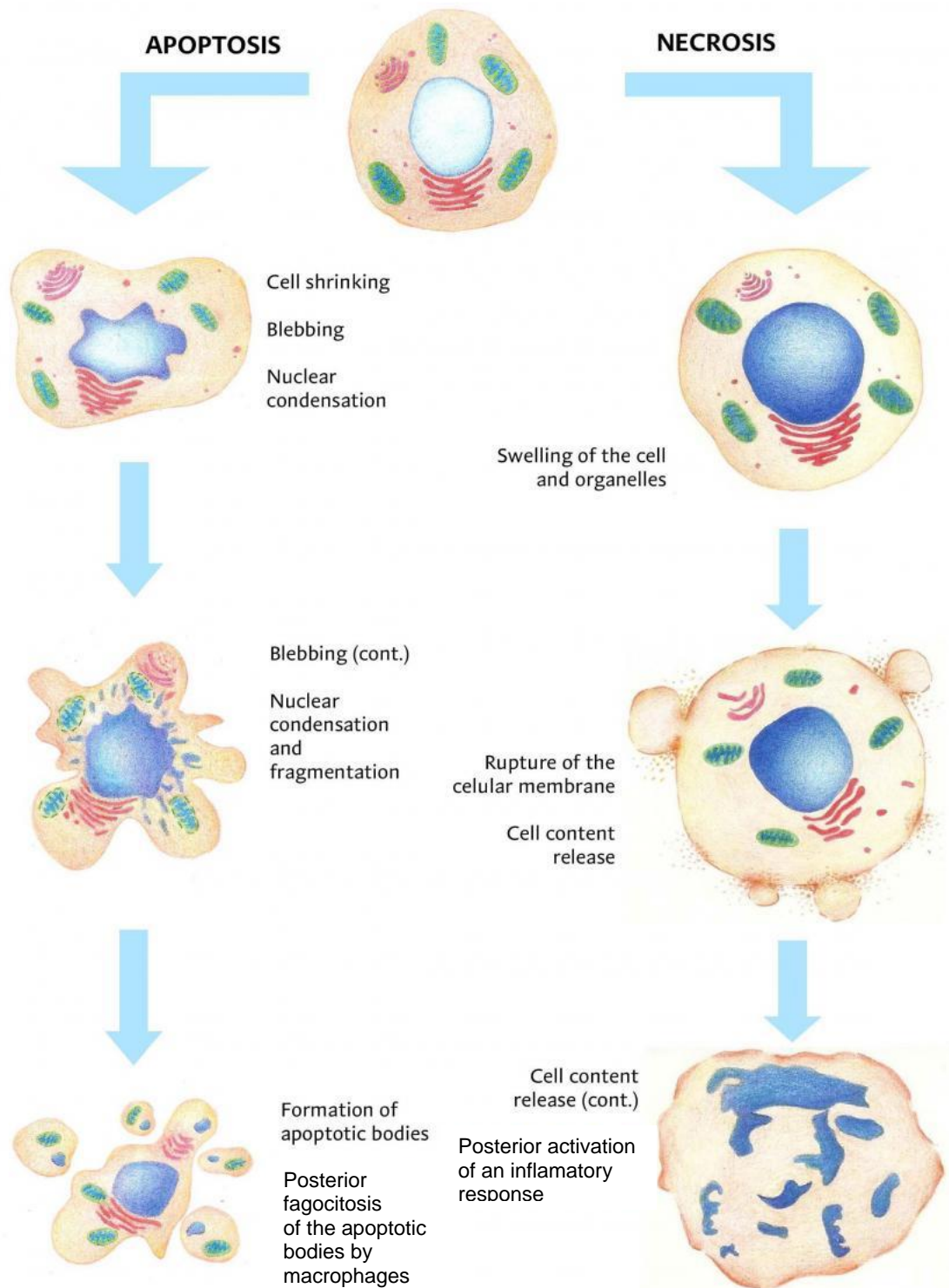
Outro teste muito utilizado para avaliar a citotoxicidade é o ensaio de retenção do corante vermelho neutro, que avalia a viabilidade celular baseado na capacidade das células viáveis para incorporar e reter o corante vermelho neutro nos lisossomos. O corante atravessa as membranas celulares por difusão passiva, concentrando-se nos lisossomos. A absorbância obtida é diretamente proporcional à capacidade dos lisossomos para reter o corante vermelho neutro, assim como à capacidade das células manterem gradientes de pH (REPETTO; DEL PESO; ZURITA, 2008).

Em nanotoxicologia, os efeitos citotóxicos podem ocorrer apenas quando células são expostas a concentrações muito altas, em contrapartida, efeitos a nível molecular podem surgir em concentrações mais baixas, sem necessariamente causar a morte das células. Um dos efeitos mais importantes é a fragmentação do DNA, geralmente atribuída ao estresse oxidativo causado por um aumento na presença de espécies reativas de oxigênio (EROs) (KARLSSON, 2010), altamente reativas quimicamente, o

que lhes permite reagir com o DNA e proteínas, podendo provocar a morte das células por apoptose ou necrose (ARORA; RAJWADE; PAKNIKAR, 2012)

Diferentes metodologias são aplicadas para detectar morte celular e distinguir entre a apoptose da necrose celular. Essas metodologias baseiam-se geralmente nas características morfológicas (redução do volume celular, formação de vesículas na membrana e condensação da cromatina) e bioquímicas (atividade de endonucleases e clivagem do DNA em sítios nucleossomais) apresentadas pelas células (Figura 7) (VAN ENGELAND *et al.*, 1996). No ensaio de apoptose e necrose por citometria de fluxo, a fosfatidilserina (FS) pode ser detectada por marcação fluorescente com Anexina V. As anexinas constituem uma família de proteínas de ligação de fosfolípidios dependentes do cálcio que se ligam preferencialmente a FS, localizada na face interna da membrana plasmática. Após o início da apoptose, FS é translocada, por movimento flip-flop, para a face protoplasmática da membrana, contudo, a integridade da membrana é mantida. No início da apoptose, a membrana plasmática exclui corantes de viabilidade, como o iodeto de propídio. No entanto, nas células em apoptose final, a membrana celular é rompida permitindo assim que a Anexina V tenha acesso ao interior da célula. O iodeto de propídio é usado para distinguir células em apoptose final (anexina V-positivo, iodeto de propídio-positivo) e células necróticas (anexina V-negativo, iodeto de propídio-positivo) das células em apoptose em estágio inicial (anexina V positivo, iodeto de propídio-negativo) (CASCIOLA-ROSEN *et al.*, 1996; VAN ENGELAND *et al.*, 1996).

Figura 7 – Representação de morte celular: apoptose e necrose.



Disponível em: <http://www.scienceinschool.org/content/cell-spotting-%E2%80%93-let%E2%80%99s-fight-cancer-together>

As NPs, em geral, também podem ter acesso ao núcleo e, conseqüentemente, ao DNA, como já foi descrito para nanopartículas de sílica (40-70 nm) (CHEN; VONMIKECZ, 2005) e nanopartículas de prata (6-20 nM) (ASHARANI *et al.*, 2009). Isso pode ocorrer durante a mitose, quando há desorganização da membrana nuclear, facilitando interações com o DNA (GONZALEZ; LISON; KIRSCH-VOLDERS, 2008).

O ensaio cometa ou SCGE (*Single cell gel eletrophoresis assay*) foi desenvolvido primeiramente por Östling e Johanson em 1984 para analisar quebras dos filamentos de DNA em condições neutras. Em 1988, Singh *et al.* desenvolveram uma versão alcalina (pH > 13) do método (KARLSSON, 2010), que permite a detecção de quebras de fita dupla do DNA e também quebras de fitas simples e sítios alcali-lábeis (TICE *et al.*, 2000).

Uma outra forma de avaliar os danos causados ao DNA é a partir do ensaio do micronúcleo. Micronúcleos são compostos por cromatina proveniente de quebras cromossômicas ou ainda de cromossomos inteiros. A partir deste ensaio, pode-se ainda observar outras aberrações cromossômicas tais como pontes nucleoplasmáticas e brotos. Tais aberrações só podem ser observadas após as células terem completado ao menos um ciclo de divisão, desta forma, a utilização da citocalasina B, impede a citocinese gerando células binucleadas, facilmente identificáveis (FENECH, 2000).

2. Justificativa

A tendência natural dos nanomateriais para formar aglomerados tem sido discutida como um fator de interferência em estudos de toxicidade. Entretanto, tal interferência pode ser atenuada com a utilização de agentes dispersores como a albumina sérica humana ou o soro fetal bovino, facilitando a internalização dos nanomateriais pelas células (JI *et al.*, 2010; SAUER *et al.*, 2015; SCHAEFER *et al.*, 2012).

Desta forma, considerando o exposto acima, apesar de TiO₂ ser considerado por alguns autores como inerte e não-tóxico (KISER *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2007), devido às diferentes propriedades físico-químicas apresentadas pelas NP-TiO₂, se faz necessária uma avaliação cuidadosa sobre os efeitos adversos que estas possam causar ao meio ambiente e à saúde humana (SHI *et al.*, 2013; WEIR *et al.*, 2012).

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Considerando a crescente utilização de NP-TiO₂ nos mais diferentes segmentos industriais e o conseqüente aporte dessas NPs nos ambientes aquáticos, o presente estudo teve por objetivo identificar os possíveis efeitos das NP-TiO₂ para hepatócitos de peixe-zebra (linhagem celular estabelecida ZF-L), *in vitro*, utilizando biomarcadores citogenéticos.

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a citotoxicidade de diferentes concentrações de NP-TiO₂ para células ZF-L após exposição de 24 horas, empregando-se os ensaios de redução do sal MTT, ensaio de exclusão do corante azul de tripano, ensaio de retenção do corante vermelho neutro e ensaio de indução de apoptose e necrose;
- Avaliar a fragmentação do DNA de células ZF-L expostas às NP-TiO₂, empregando-se o ensaio do Cometa;
- Avaliar a fixação de danos no DNA de células ZF-L expostas às NP-TiO₂, empregando o ensaio do micronúcleo (MN).

4. Materiais e Métodos

4.1. Meios de Cultivo e reagentes químicos

NP-TiO₂ em pó (AEROXIDE® TiO₂ P 25) foram adquiridas da Evonik Degussa Brasil Ltda (80% anatase e 20% rutilo, 99.5% de pureza, tamanho médio de 21 nm e superfície específica de 50 ± 15 m² g⁻¹). O meio de cultivo RPMI 1640 e a solução antibiótica/antimicótica (10.000 unidades de penicilina; 10 mg de estreptomicina; 25 µg de anfotericina B mL⁻¹) foram obtidos de Sigma-Aldrich (St. L-USA). O meio de cultivo Leibovitz L-15, o soro fetal bovino (SFB) e a tripsina foram adquiridos da Cultilab materiais para cultura de células Ltda (Campinas-SP, Brasil).

4.2. Linhagem celular ZF-L

Células da linhagem estabelecida (ZF-L) derivada de fígado de peixe zebra (*Danio rerio*) (ZF-L) (06/10/2004-BCRJ No: 0256/303, passagens de 9-17) foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), Duque de Caxias-RJ, Brasil e cultivadas em frascos de cultivo de 75 cm² em meio de crescimento contendo: 50% Leibovitz L-15; 40% RPMI 1640; 0.1% antibiótico/antimicótico, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e mantidas a 28°C, em estufa com CO₂ atmosférico.

4.3. Caracterização e dinâmica das NP-TiO₂ em suspensão

Foi preparada uma solução estoque de NP-TiO₂ na concentração de 500 µg mL⁻¹ em H₂O deionizada e armazenada a 4 °C no escuro. A caracterização das NP-TiO₂, com relação ao tamanho das partículas, potencial de aglomeração e cargas de superfície, foi realizada conforme recomendado por Gullledge (2007).

A partir da solução estoque, previamente sonicada por 30 minutos em banho ultrassônico (frequência de 40 KHz, Q335D, QUIMIS, Diadema-SP, Brasil) foram preparadas amostras de NP-TiO₂ em meio de cultivo com ou sem soro fetal bovino (SFB), nas concentrações finais de: 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 25,0; 50,0 e 75,0 µg mL⁻¹. Os tamanhos hidrodinâmicos dos aglomerados de NP-TiO₂ (DLS - diameter light scattering) e medidas de potencial zeta foram avaliados utilizando um espectrofotômetro por espalhamento de luz (Zetasizer Nano ZS90, Malvern Instruments, Westborough, MA, EUA). O tamanho das NP-TiO₂ foi acessado utilizando um microscópio eletrônico de transmissão (MET) (Philips CM-120, FEI Co., Hillsboro,

Oregon, USA). O maior diâmetro visível de NPs (n = 30 imagens) foi medido utilizando um programa de análise de imagem (Image-Pro Plus 6.0, Media Cybernetics, MD-USA).

A partir da solução estoque de NP-TiO₂, sonicada por 30 minutos antes de cada experimento, foram realizadas diluições em meio de cultivo, como descrito no item 3.2, obtendo as concentrações: 0,25; 0,5; 0,75 e 1,0 µg ml⁻¹, que foram utilizadas nos experimentos de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade. Os resultados dos ensaios foram comparados com um controle negativo (CN, meio de cultivo suplementado com SFB). Os ensaios de genotoxicidade e mutagenicidade foram comparados também com um controle positivo (CP, metil metano sulfonato (MMS) 1mM, por 4).

4.4. Viabilidade Celular

4.4.1. Ensaio de exclusão do corante azul de tripano

O ensaio foi realizado de acordo com Strober (1997), com algumas modificações. As células foram semeadas em placas de 24 poços a densidade de 1.0x10⁶ células por poço e incubadas por 24 horas para estabilização. Em seguida, as células foram expostas às NPs. Após 24 horas de exposição, as células foram lavadas 2 vezes com PBS livre de Ca⁺² e Mg⁺² (136,9 mM NaCl; 2,7 mM KCL; 1,5 mM KH₂PO₄; 8,1 mM Na₂HPO₄) e tripsinizadas. Em eppendorf, alíquotas de 20 µL de suspensão celular de cada tratamento foram homogeneizadas com 20 µL de corante azul de tripano. Dessa mistura, 10 µL foram tomados e depositados em uma câmara específica, utilizada para fazer a contagem de células viáveis em um contador automático (TC20tm Cell Counter, Bio-Rad, São Paulo-SP, Brasil), realizada em triplicata. A percentagem de células viáveis (não coradas) e não-viáveis (coradas em azul) foi calculada de acordo com a Equação: Células viáveis = (Total de células viáveis / Total de células contadas) * 100. O experimento foi realizado em triplicata (em diferentes períodos).

4.4.2. Ensaio MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio)

Antes do ensaio definitivo, o ensaio foi validado a partir da investigação da influência de propriedades fotocatalíticas das NP-TiO₂ que poderiam catalisar reações

redox de moléculas adsorvidas à sua superfície. Para isto, células ZF-L foram semeadas em placas transparentes de 96 poços, em colunas alternadas (colunas com e sem células) a densidade de $2,5 \times 10^5$ células por poço e incubadas por 24 horas em estufa a 28 °C, com CO₂ atmosférico. Após estabilização, os poços com células foram expostos às concentrações 0,0; 0,25; 0,5; 0,75; 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de NP-TiO₂ por 24 horas. Ao final da exposição, somente os poços contendo células foram lavados 2 vezes com PBS e foram adicionados 100 μL da solução de MTT ($0,5 \text{ mg mL}^{-1}$). Simultaneamente, os poços sem células foram tratados com as mesmas concentrações de NP-TiO₂, porém diluídas em solução de MTT ($0,5 \text{ mg mL}^{-1}$) contendo SFB. As placas foram incubadas por 4 horas, em seguida foram adicionados 200 μL de dimetilsulfóxido (DMSO) e homogeneizado com auxílio de micropipeta multicanal. A absorbância de cada amostra foi determinada em leitora de microplacas (SpectraMax® M5 Multi-Mode, Molecular Devices, USA) a 540nm.

Após a validação, a citotoxicidade das NP-TiO₂ foi avaliada pelo método de redução do sal MTT (MOSMANN, 1983). As células foram semeadas em placas transparentes de 96 poços a uma densidade de $2,5 \times 10^5$ células por poço e incubadas por 24 horas de estabilização, em estufa a 28 °C, com CO₂ atmosférico. Em seguida, as células foram expostas às NPs por 24 horas. Após a exposição, as células foram lavadas 2 vezes com PBS e foram adicionados 100 μL da solução de MTT ($0,5 \text{ mg mL}^{-1}$), e as células foram novamente incubadas por 4 horas. Em seguida, o meio de cultivo contendo a solução MTT foi removido, foram adicionados 200 μL de dimetilsulfóxido (DMSO) e homogeneizados com auxílio de micropipeta multicanal. A absorbância de cada amostra foi determinada em leitora de microplacas (SpectraMax® M5 Multi-Mode, Molecular Devices, Califórnia, USA) a 540nm. O experimento foi realizado em triplicata (em diferentes períodos).

4.4.3. Ensaio de retenção do corante vermelho neutro

O ensaio foi realizado baseado no protocolo de Repetto; Peso; Zurita (2008), com algumas modificações. As células foram semeadas a densidade de $2,5 \times 10^5$ células por poço e incubadas para estabilização por 24 horas em estufa sem CO₂ a 28 °C. Passadas 24 horas de estabilização, as células foram expostas às NP-TiO₂ por 24 horas. Ao final do período de exposição, as células foram lavadas 2 vezes com PBS e incubadas por 4 horas com a solução de vermelho neutro ($40 \mu\text{g mL}^{-1}$ em PBS).

Posteriormente, as células foram lavadas 2 vezes com PBS, para remover o corante não incorporado nos lisossomos e, então, foram adicionados 150 μL de uma solução composta de 50% etanol, 49% água destilada e 1% ácido acético glacial a cada poço e homogeneizadas com auxílio de pipeta multicanal. A absorbância de cada amostra foi determinada em leitora de microplacas (Dynex Technologies Ltda., MRXTC, UK.) a 540 nm. O experimento foi realizado em triplicata (em diferentes períodos).

4.4.4. Ensaio de apoptose e necrose em citômetro de fluxo

O ensaio de indução de apoptose e necrose foi realizado de acordo com o protocolo fornecido por Becton & Dickson, San Jose, CA, USA. Células ZF-L foram semeadas em placas transparentes de 24 poços a densidade de $5,0 \times 10^5$ células por poço, estabilizadas por 24 horas. Após estabilização, as células foram expostas às NPs por 24 horas e, em seguida, foram lavadas com PBS e removidas da placa utilizando um scraper. As células então foram marcadas utilizando o Kit Anexina V – FITC (apoptose), e PI (iodeto de propídio - necrose) (COD. 556547, BD Biosciences). Foram utilizados 4 controles para validar o ensaio: células não tratadas e não marcadas; não tratadas duplamente marcadas, para necrose (iodeto de propídio-PI) e para apoptose (FITC anexina V); mortas marcadas com PI; mortas marcadas com FITC anexina V. O ensaio foi realizado em um citômetro de fluxo (BD Accuri™ C6, San Jose, CA-EUA). Foram analisados 15.000 eventos para cada amostra, em duplicata.

4.5. Determinação de danos genotóxicos no DNA pelo Ensaio do Cometa

Células ZF-L foram semeadas a uma densidade de $2,0 \times 10^6$ em frascos de cultivo de 25 cm^2 e expostas às diferentes concentrações de NP-TiO₂ por 24 horas e ao CP por 4 horas. Após a exposição, as lâminas foram confeccionadas seguindo o protocolo descrito por Singh *et al.* (1988). As lâminas ficaram em descanso por 30 minutos em cuba de eletroforese, cobertas com tampão (EDTA titriplex 200mM; NaOH 10N; H₂O deionizada a 4°C) e protegidas da incidência de luz. A eletroforese foi conduzida a 25V e 300 mA durante 20 minutos, no escuro. Ao final da eletroforese, as lâminas passaram por 3 banhos de 5 minutos cada em H₂O gelada, fixadas com etanol absoluto e secas a temperatura ambiente. As lâminas foram coradas com 20 μL de

solução de Gel Red (15µL Gel Red 10.000X em 5mL NaCl 1M e 45mL de água deionizada) e foram capturadas imagens em microscópio de fluorescência (Olympus BX-UCB, PA-USA) em um aumento de 200 vezes, com filtro de excitação de 515-560 nm e um filtro de barreira de 590 nm. O experimento foi realizado em triplicata (em diferentes períodos), totalizando 6 lâminas por tratamento. Os danos no DNA foram analisados utilizando um software OpenComet (versão 1.3), a partir da migração dos fragmentos de DNA (percentual do comprimento da cauda e percentual de DNA contido na cauda).

4.6. Determinação de danos mutagênicos no DNA pelo Ensaio do Micronúcleo (MN) com bloqueio da citocinese

As células foram semeadas e expostas às NPs e ao CP como no item 2.5. Após a exposição, as células foram lavadas 2 vezes com PBS, foram adicionados 50 µL de citocalasina B (300 µg mL⁻¹) e as células foram incubadas por 72 horas. A confecção das lâminas seguiu o protocolo descrito por (FENECH, 2000). A coloração das lâminas foi feita utilizando uma solução de Giemsa (5%) por 10 minutos. Foram contadas 1000 células binucleadas por lâmina, utilizando microscópio óptico de luz (Olympus BX-UCB) com aumento de 400 vezes, contabilizando as células binucleadas portadoras de micronúcleo, pontes e brotos. O experimento foi realizado em triplicata, totalizando 6 lâminas por tratamento.

4.7. Análises estatísticas

Primeiramente foram aplicados os testes de normalidade (Bonferroni ou Shapiro-Wilk) e teste de homogeneidade de variâncias (Bartlett), seguidos dos testes one-way ANOVA ou seu equivalente não-paramétrico (Kruskal-Wallis), com pós teste (Dunnet ou Dunn, respectivamente) para verificar diferenças significativas. Os dados paramétricos são apresentados como média ± erro padrão (EP) ou mediana ± intervalo interquartil (IQR), quando os dados são não-paramétricos. As análises foram realizadas com nível de significância de 0,05, utilizando o software GraphPad Prism Versão 7.00 (San Diego Califórnia, EUA).

5. Resultados

5.1. Caracterização e dinâmica das NP-TiO₂ em suspensão

O tamanho das partículas, o diâmetro hidrodinâmico dos aglomerados e cargas de superfície foram obtidos experimentalmente. O tamanho das NP-TiO₂, medido em microscopia eletrônica de transmissão (TEM), coincide com o informado pelo fabricante (média 21 nm, Evonik Degussa Brasil Ltda.) (Fig. 8). As medições do potencial zeta são mostrados na Tabela 1.

Figura 8 – Eletromicrografia de NP-TiO₂ em suspensão em água Mili-Q. Barra de escala = 100 nm.

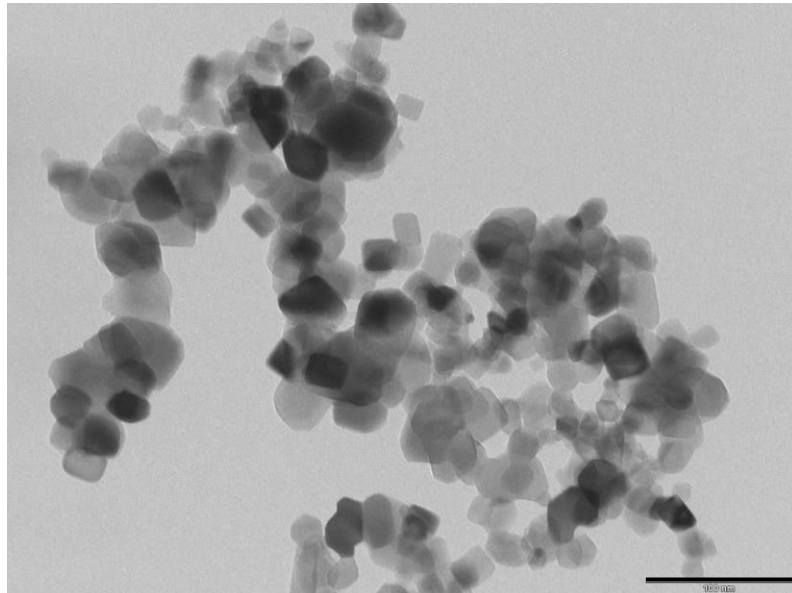
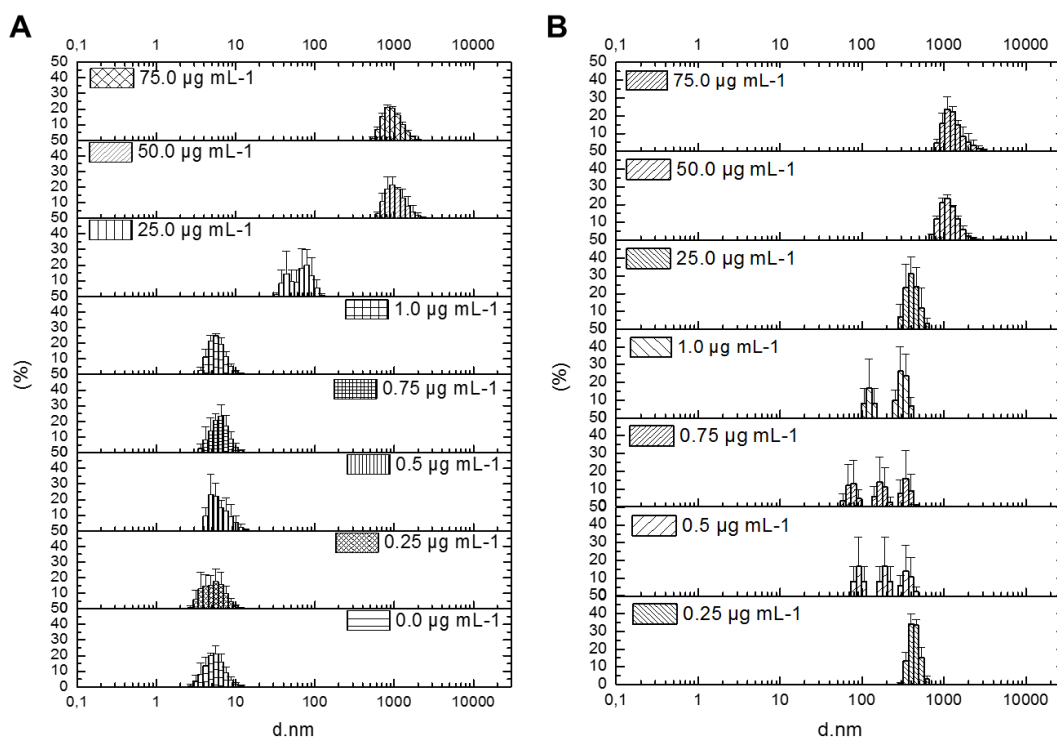


Tabela 1 – Potencial zeta (mV) de diferentes concentrações de NP-TiO₂ (média ± EP) suspensas em meio de cultivo, com e sem adição de soro fetal bovino.

NP-TiO ₂	Potencial zeta (mV)	
	RPMI + L-15 com SFB	RPMI + L-15 sem SFB
0,00 µg mL ⁻¹	-08,94 ± 0,38	-
0,25 µg mL ⁻¹	-09,50 ± 0,40	-11,73 ± 0,18
0,50 µg mL ⁻¹	-07,76 ± 0,44	-13,50 ± 0,87
0,75 µg mL ⁻¹	-08,08 ± 0,62	-11,80 ± 0,45
1,00 µg mL ⁻¹	-08,64 ± 0,41	-03,93 ± 0,64
25,0 µg mL ⁻¹	-07,95 ± 0,33	-10,43 ± 0,34
50,0 µg mL ⁻¹	-10,15 ± 0,42	-09,32 ± 0,43
75,0 µg mL ⁻¹	-06,40 ± 0,24	-10,23 ± 0,47

Os diâmetros hidrodinâmicos dos aglomerados de NP-TiO₂ são mostrados na Fig. 9. É importante salientar que os aglomerados formados em meio de cultura com SFB, até a concentração de 1,0 µg mL⁻¹, apresentam um diâmetro hidrodinâmico de 10 nm, enquanto que, a uma concentração de 25 µg mL⁻¹, os diâmetros hidrodinâmicos chegam a 100 nm. Acima desta concentração, os aglomerados apresentam diâmetros superiores a 500 nm, atingindo 1100 nm (Fig. 9a). A ausência de SFB em meio de cultura envolve a formação de aglomerados com um diâmetro hidrodinâmico superior a 100 nm em todas as concentrações testadas (Fig. 9b).

Figura 9 – Distribuição e tamanho (d. nm) dos aglomerados de NP-TiO₂ em diferentes concentrações (0,0; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 25,0; 50,0 e 75 µg mL⁻¹), suspensas em RPMI 1640 + Leibovitz L-15 com soro fetal bovino (A) e apenas RPMI 1640 + Leibovitz L-15 (B). A ausência de um controle negativo (0,0) em B se justifica pela inexistência de partículas.



5.2. Viabilidade celular

A validação pelo ensaio MTT mostrou que não houve redução do sal MTT que pudesse ter sido decorrente de atividade fotocatalítica das NP-TiO₂ (Fig. 10).

Após 24 horas de tratamento, as células foram submetidas ao ensaio de exclusão do corante azul de Tripano, ensaio de redução do sal MTT e ensaio de retenção do corante vermelho neutro para avaliar a viabilidade celular. Com base no ensaio de azul de tripano, as NP-TiO₂ causaram um decréscimo significativo na viabilidade das células, a partir de 0,5 µg mL⁻¹. A viabilidade celular manteve-se inalterada quando avaliada pelo ensaio MTT. No entanto, por meio do ensaio de retenção do corante vermelho neutro foi possível detectar um aumento significativo na capacidade de células ZF-L em reter o corante vermelho neutro nos lisossomos a partir de 0,5 µg mL⁻¹, que foi atribuído a um aumento na presença de lisossomos (Fig. 11).

Figura 10 – A redução do sal MTT com e sem células. Exposição à NP-TiO₂ (0,25 – 1 µg mL⁻¹).

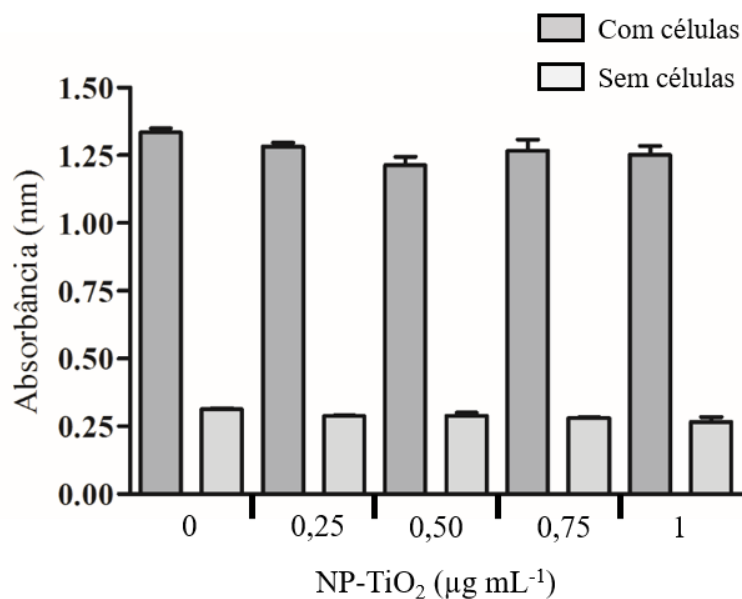
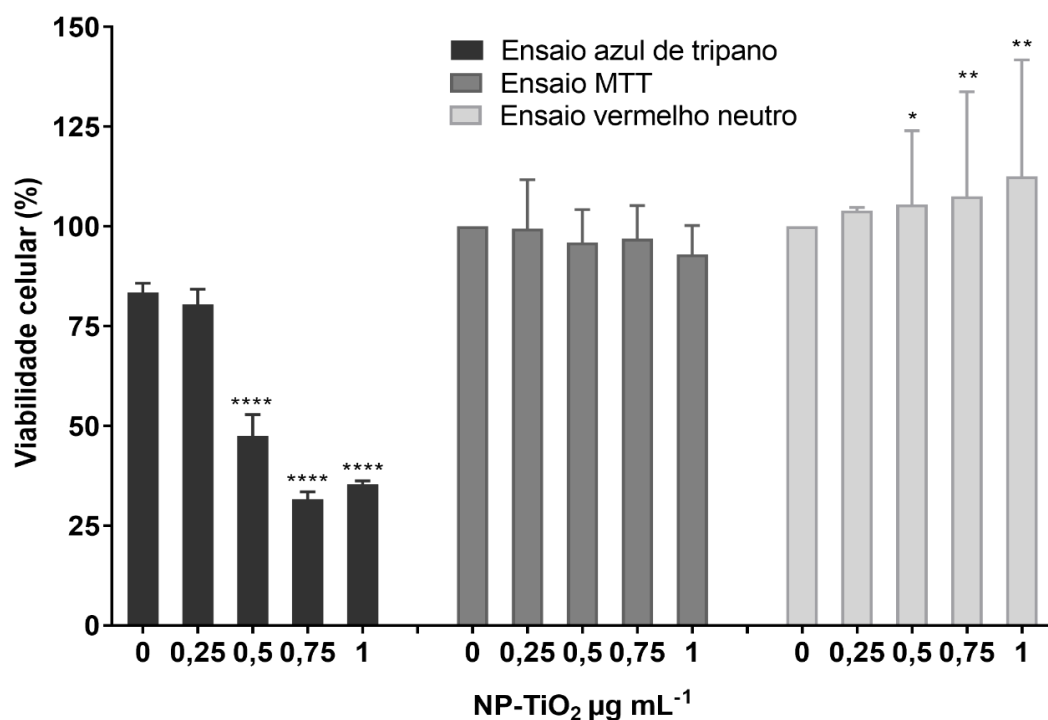


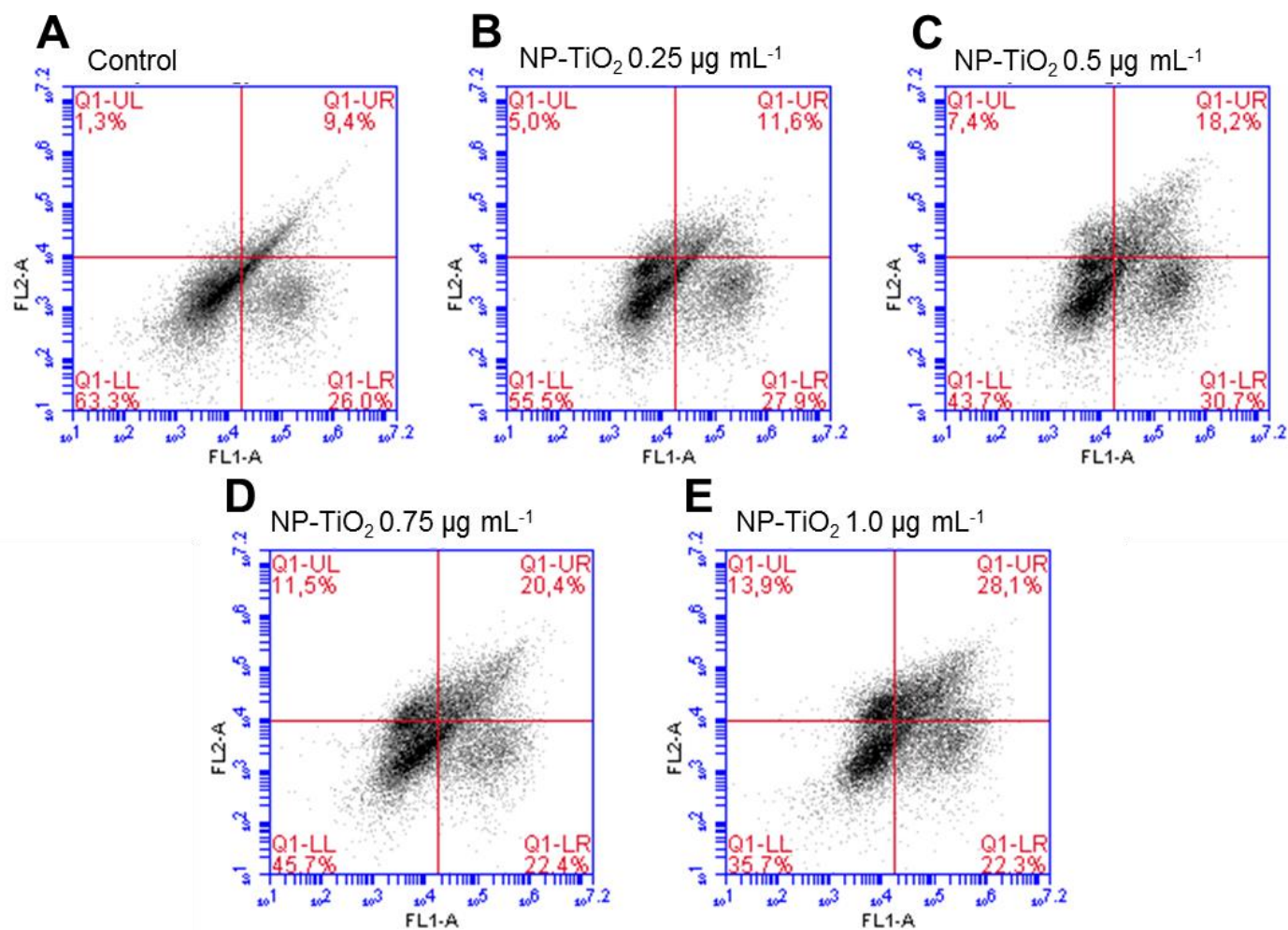
Figura 11 – Viabilidade de células ZF-L após exposição à NP-TiO₂ durante 24 horas, determinada pelos ensaios: exclusão do corante azul de tripano; redução do sal MTT; retenção do corante vermelho neutro. Os resultados foram expressos como média ± EP (azul de tripano), e mediana ± IQR (MTT; vermelho neutro). Os asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao CN: * p<0,05; ** p<0,005; **** p<0,0001.



5.3. Apoptose e necrose

O escaneamento por citômetro de fluxo mostrou a incidência de células em apoptose e necrose (Fig. 12). O percentual de células viáveis (Q1-LL) caiu de 63,3% no CN para apenas 35,7% na maior concentração de NP-TiO₂ (1,0 µg mL⁻¹). O percentual de células necróticas (Q1-UL) apresentado no CN foi de 1,3% e aumentou de forma dose-dependente com as concentrações de NP-TiO₂, atingindo um percentual de 13,9% na máxima concentração testada, um percentual 10 vezes maior que o apresentado no CN. Células em apoptose total (Q1-LR + Q1-UR) apresentaram um percentual de 35,4% no CN e atingiram 50,4% na máxima concentração testada.

Figura 11 – Células ZF-L não tratadas (A) ou tratadas (B – E) com NP-TiO₂, durante 24 horas. As células viáveis são mostradas em Q1-LL. A ocorrência de apoptose inicial (Q1-LR), apoptose final (Q1-UR) e necrose (Q1-UL) foi medida por citometria de fluxo.



5.4. Genotoxicidade e mutagenicidade

Os resultados do ensaio de cometa (Fig. 13 e 14) mostraram que, após 24 horas de exposição às NP-TiO₂ houve fragmentação do DNA, demonstrado tanto pelas medidas de comprimento da cauda quanto para as medidas de percentual de DNA contido na cauda. Diferenças significativas a partir de 0,75 µg mL⁻¹.

Figura 12 – Fragmentação do material genético medida pelo ensaio do cometa em células ZF-L. Os resultados foram expressos como mediana ± IQR. Os asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao CN: ** p<0,005; **** p<0,0001.

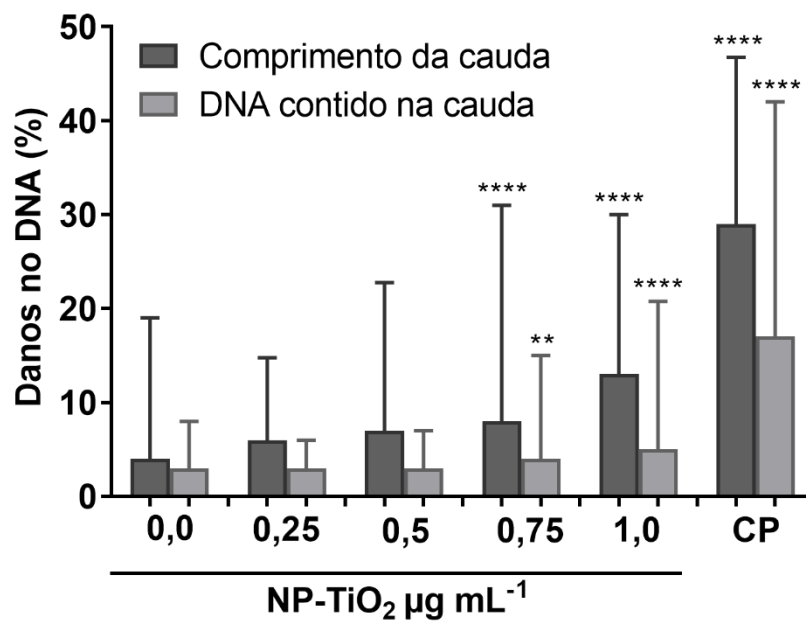
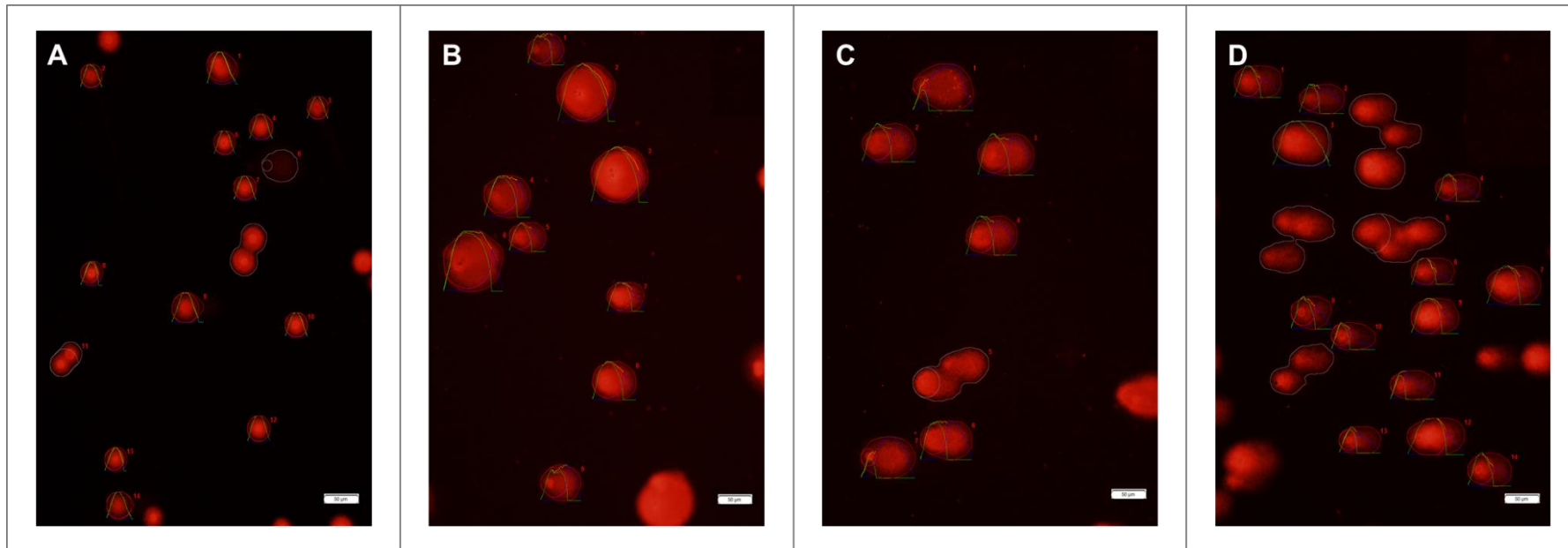


Figura 13 – Imagens da fragmentação do material genético das células ZF-L. **A.** Controle negativo, meio de cultivo + SFB; **B.** Células expostas à NP-TiO₂ (0,75 µg mL⁻¹) por 24 horas; **C.** Células expostas à NP-TiO₂ (1 µg mL⁻¹) por 24 horas; **D.** Controle positivo, células expostas ao metil metano sulfonato (1 mM) por 4 horas. A barra de escala representa 50 µm.



A indução de aberrações cromossômicas em células binucleadas foi avaliada pelo ensaio do MN (Fig. 15 e 16), após tratamento com diferentes concentrações de NP-TiO₂ por 24 horas. Foi observado um aumento significativo na frequência de micronúcleos a uma concentração de 0,75 µg mL⁻¹ e um aumento significativo na frequência de brotos (C), em concentrações de 0,5 e 0,75 µg mL⁻¹. A ocorrência de pontes nucleoplasmáticas não foi significativa para células expostas a NP-TiO₂.

Figura 14 – Indução de pontes nucleoplasmáticas, micronúcleos e brotos após 24 horas de exposição à NP-TiO₂. Os resultados foram expressos como média ± EP (micronúcleos), e mediana ± IQR (pontes e brotos). Os asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao CN: * p<0,05; ** p<0,005; **** p<0,0001.

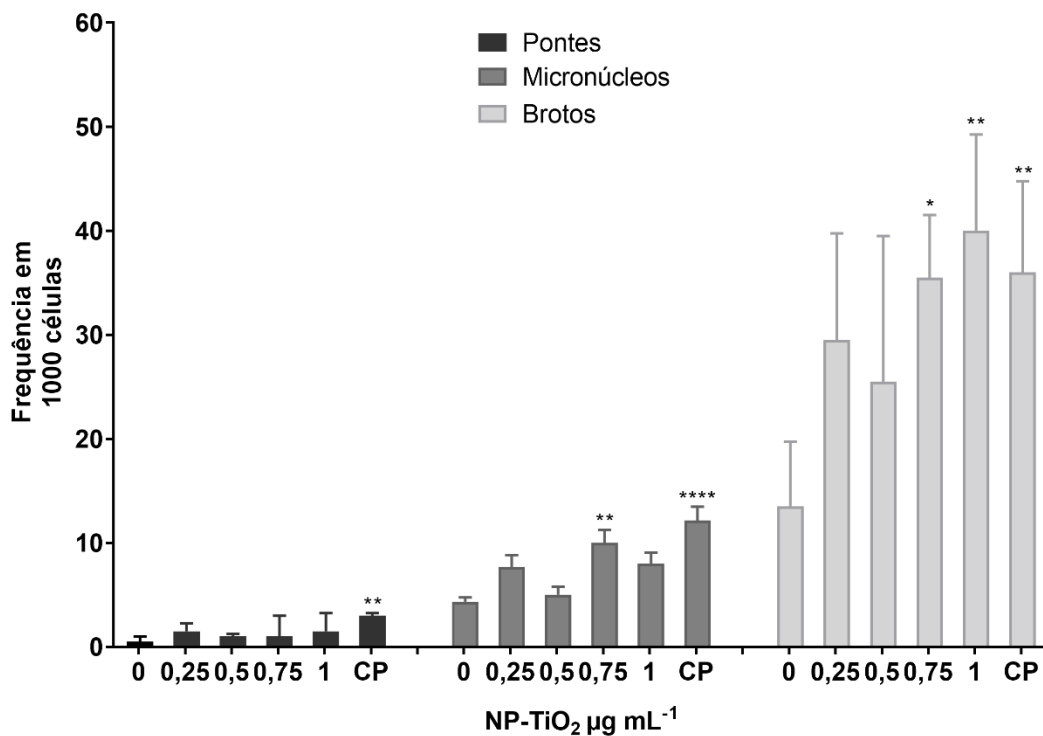
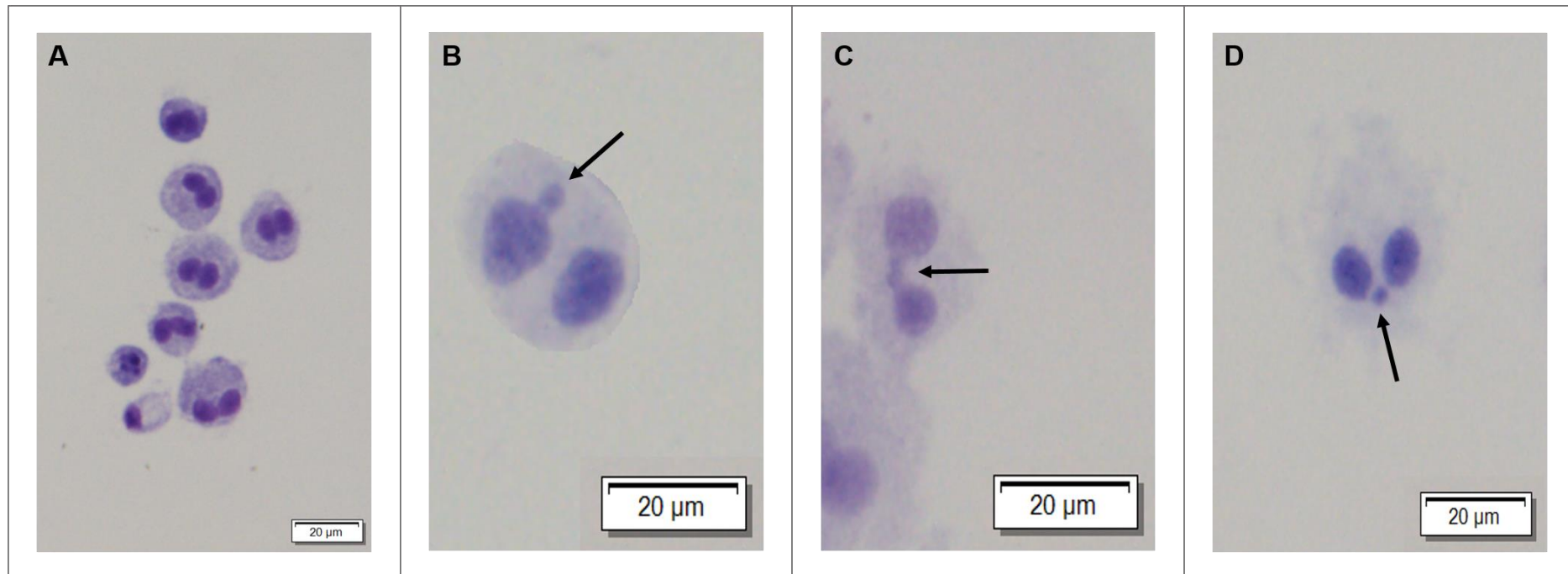


Figura 15 – Imagens das aberrações cromossômicas apresentadas pelas células ZF-L. **A.** Células binucleadas viáveis, sem aberrações cromossômicas; **B.** Célula binucleada com broto (seta preta); **C.** Célula binucleada com ponte nucleoplasmática (seta preta); **D.** Célula binucleada com um micronúcleo (seta preta).



6. Discussão

A toxicidade dos NMs, comumente atribuída ao seu tamanho, forma e capacidade de dispersão, está diretamente relacionada à forma de preparação da suspensão (HANDY *et al.*, 2008a). A tendência natural das NPs a se aglomerarem é um fator de interferência na investigação da sua toxicidade (SCHAEFER *et al.*, 2012), embora estudos já tenham demonstrado que o soro fetal bovino (SFB), na concentração de 10% melhora a dispersão de NPs em diversos meios de cultivo (JI *et al.*, 2010). As NPs interagem com as proteínas do SFB formando uma camada característica denominada "corona" em sua superfície, minimizando a formação dos aglomerados (SAUER *et al.*, 2015). A exposição a uma dosagem de NPs com a formação de aglomerados minimizada propicia resultados mais confiáveis na investigação da toxicidade de NP-TiO₂.

Um potencial zeta maior que +/- 30 mV é considerado um valor limiar adequado para a estabilidade da suspensão coloidal (LEE *et al.*, 2009), uma vez que as partículas carregadas se repelem umas às outras e essa força supera a tendência natural à agregação. Neste caso, ainda que os tamanhos hidrodinâmicos dos aglomerados tenham permanecido abaixo de 100 nm, os valores de potencial zeta das suspensões de NP-TiO₂, tanto em meio com SFB quanto em meio sem SFB, foram baixos, indicando instabilidade das suspensões.

Células viáveis devem ser capazes de desempenhar funções metabólicas, crescimento e reprodução. Essas funções podem ser comprometidas quando membranas celulares e ou organelas são afetadas, o que pode acarretar no comprometimento do organismo como um todo. Neste estudo, a citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade de diferentes concentrações de NP-TiO₂ foi investigada para a linhagem estabelecida de hepatócitos de peixe zebra, células ZF-L.

Diversos estudos já relataram a diminuição da viabilidade celular após exposição às NP-TiO₂. Essas NPs podem causar ruptura das membranas plasmáticas, inibição da atividade mitocondrial e mal funcionamento dos lisossomos (DI VIRGILIO *et al.*, 2010; SIMON-DECKERS *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2011). NP-TiO₂ podem ainda, induzir a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), e desta forma podem

causar danos no DNA, e a formação de micronúcleos em células de truta arco-íris (RTG-2) (VEVERS; JHA, 2008) e danos no DNA de linfócitos humanos (GHOSH; CHAKRABORTY; MUKHERJEE, 2013). Além disso, NP-TiO₂ podem induzir a apoptose e necrose em células de mamíferos (LIU *et al.*, 2010; PARK *et al.*, 2008; SHI *et al.*, 2010; VAMANU *et al.*, 2008).

No presente estudo, a viabilidade celular foi avaliada após exposição à NP-TiO₂ utilizando diferentes ensaios, que avaliaram a integridade das membranas celulares, a atividade metabólica mitocondrial e a atividade lisossomal. Adicionalmente, o escaneamento por citometria de fluxo nos permitiu avaliar a indução de apoptose, tanto em fase inicial quanto em fase final, e também a indução de necrose. Os resultados obtidos nos ensaios de viabilidade celular (citotoxicidade) foram analisados de forma integrada, fornecendo informações importantes sobre a ação das NP-TiO₂ sobre as células ZF-L.

Algumas alterações morfológicas caracterizam a necrose, distinguindo-a da apoptose. Por exemplo, na necrose, as mitocôndrias dilatam-se, e pode haver hiperdensidade dessas organelas, outras organelas são dissolvidas e há rompimento da membrana plasmática, liberando o material citoplasmático; que muitas vezes provoca uma resposta inflamatória. Por outro lado, durante a apoptose, o citoplasma encolhe e a cromatina condensa, mas as organelas mantêm a sua integridade, assim como as membranas mantêm a permeabilidade seletiva (BRAS; QUEENAN; SUSIN, 2005; CHEKENI *et al.*, 2010; DESAGHER; MARTINOU, 2000). Estas características corroboram os resultados obtidos no ensaio azul de tripano, em que foi observada ruptura das membranas celulares. A ruptura das membranas pode ser associada à necrose somada à apoptose final, uma vez que na apoptose final há um rearranjo das membranas para formação dos corpos apoptóticos (LUI *et al.*, 2007), permitindo a entrada de corantes de viabilidade.

Os resultados obtidos no ensaio de apoptose e necrose também estão de acordo com os obtidos no ensaio MTT, uma vez que o efeito citotóxico das NP-TiO₂ para as mitocôndrias foi baixo e a viabilidade mitocondrial não foi significativamente afetada.

A não-responsividade das mitocôndrias também pode ser atribuída à autofagia, um mecanismo dependente de lisossomos que se encarrega de degradar organelas

e proteínas danificadas (MIZUSHIMA; YOSHIMORI; OHSUMI, 2011; XIE; KLIONSKY, 2007). Além disso, mitocôndrias possuem seu próprio DNA e são capazes de realizar replicação, o que lhes permite manter o seu número inicial (DESAGHER; MARTINOU, 2000; LIN; BEAL, 2006).

Complementarmente, alguns resultados contraditórios têm sido reportados evidenciando que a densidade utilizada nos ensaios, a concentração de NPs e o tempo de exposição são variáveis importantes para estudos *in vitro*. Por exemplo, a viabilidade das mitocôndrias de células de ovário de hamster chinês (CHO-k1, não-metabolizadoras) semeadas a uma densidade de $2,5 \times 10^4$ células por poço diminuiu após 24 horas de exposição to 5; 25; 50; 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ TiO_2 -NP (Degussa P-25) (DI VIRGILIO *et al.*, 2010). Similarmente, outro estudo utilizando a mesma linhagem celular, semeadas a uma densidade de $2,5 \times 10^5$ cells mL^{-1} (o equivalente a 5×10^4 células por poço), e as mesmas concentrações de NPs não obteve alteração na viabilidade mitocondrial após 24 horas; somente após 48 horas de exposição, a viabilidade mitocondrial foi reduzida em 30% na concentração de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ NP- TiO_2 (WANG; YU; WICKLIFFE, 2011). Células humanas A549 (tipo II) expostas a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ NP- TiO_2 (Degussa P-25) tiveram sua viabilidade diminuída em 26% após 48 horas (SIMON-DECKERS *et al.*, 2008). Considerando que estudos *in vitro* devem ser relevantes para estudos *in vivo*, ambos os estudos citados utilizaram concentrações de NP- TiO_2 muito altas, as quais favorecem a formação de grandes aglomerados, dificultando a sua disponibilidade para as células, podendo resultar em falso positivo ou negativo para toxicidade.

A proliferação de lisossomos, demonstrada pelo ensaio de retenção de vermelho neutro, pode ser associada à endocitose das NPs (HANDY *et al.*, 2008b). NP- TiO_2 já foram observadas dentro dos lisossomos em rim de truta arco-íris (SCOWN *et al.*, 2009). Além disso, a proliferação lisossomos também foi observada em um estudo de células HaCaT (queratinócitos humanos) expostas durante 24 horas a nanopartículas de prata (AgNP) extraídas de frutos pretos da baga de sabugueiro europeu, em que os autores observaram um aumento na presença de lisossomos por meio da avaliação das imagens de microscopia eletrônica de transmissão (DAVID *et al.*, 2014). Contudo, outro estudo utilizando células GFSK-S1 (pele) expostas à NP- TiO_2 (0; 0,1; 0,5; 1; 5; 25; 50; 100; 500 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$), na ausência de fotoativação, não tiveram a

integridade lisossomal afetada significativamente, mesmo na concentração mais elevada (REEVES *et al.*, 2008). A variabilidade dos resultados encontrados entre os estudos supracitados pode estar relacionada não só com a metodologia de preparação e dosagens utilizadas, mas também à suscetibilidade inerente a cada tipo celular e a sua capacidade intrínseca para a regeneração e resistência. Neste caso, as células GFSK-S1 comparadas com ZF-L podem ser mais resistentes ou ter maior capacidade de regeneração.

O teste do cometa mostrou a fragmentação do DNA de células ZF-L, após exposição às NP-TiO₂ por 24 horas. Em adição, os danos mutagênicos foram observados a partir da formação de micronúcleos em células ZF-L. A indução de micronúcleos e brotos, apesar de significativas estatisticamente, foram relativamente baixas. Isso ocorreu porque tais anomalias representam danos irreversíveis que exigiriam resultados muito mais expressivos que os obtidos pelo ensaio cometa.

Ghosh *et al.* (2013) expuseram linfócitos humanos às NP-TiO₂ (25; 50 e 100 µg mL⁻¹) por 3 horas. Eles obtiveram uma significativa fragmentação do DNA dessas células somente na concentração de 25 µg mL⁻¹. Neste caso, a fragmentação do DNA não foi significativa nas maiores concentrações (50; 100 µg mL⁻¹), o que pode ser atribuído à formação de grandes aglomerados que não são internalizados pelas células. Adicionalmente, células RTG-2 (células de peixe) expostas à NP-TiO₂ (50 µg mL⁻¹) por 4 horas (sem fotoativação por UVA), em meio de cultivo (MEM), apresentaram uma redução na fragmentação do DNA, em relação ao controle negativo. Os autores atribuíram este resultado a uma menor absorção das NPs pelas células devido à formação de aglomerados inerente ao NMs (VEVERS; JHA, 2008). O mesmo estudo com células RTG-2 também avaliou a formação de micronúcleos após exposição às NP-TiO₂ (10; 50 µg mL⁻¹) por 48 horas, cujos resultados acompanharam os obtidos no ensaio cometa, ou seja, houve uma diminuição da indução a micronúcleos em comparação ao controle negativo. Eles atribuíram os resultados ao fato da viabilidade das células (determinada pelo ensaio de retenção do corante vermelho neutro) somente ter sido significativamente afetada quando exposta à dose mais alta (MEM+ 50 µg mL⁻¹ NP-TiO₂), ou quando em combinação com UVA (MEM + 50 µg mL⁻¹ NP-TiO₂ + 3kJ) (VEVERS; JHA, 2008).

7. Conclusões

No presente trabalho foram avaliados os efeitos citotóxicos sobre as membranas celulares, mitocôndrias e lisossomos, bem como a indução de morte celular por apoptose e necrose. Os danos genotóxicos (fragmentação do DNA) e mutagênicos (formação de micronúcleos, pontes nucleoplasmáticas e brotos) sobre a linhagem celular derivada de hepatócitos de peixe zebra, decorrentes da exposição às NP-TiO₂, também foram avaliados.

Secundariamente, avaliamos a eficácia do SFB, que mostrou ser um excelente dispersor das NP-TiO₂. Entretanto em concentrações \geq de 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ são formados aglomerados maiores do que 1000 nm. Com isso, podemos inferir que a formação de aglomerados está relacionada não só com as características do meio em que NPs se encontram (pH, concentração de partículas, força iônica), mas também à sua concentração neste meio.

Os efeitos causados às mitocôndrias não foram completamente elucidados. O fato da atividade mitocondrial não ter sido afetada não significa, necessariamente, que estas organelas não tenham sido afetadas. A resposta mitocondrial, associada à resposta dos lisossomos, nos permite inferir sobre a ação das NPs sobre estas organelas, indicando a necessidade de uma investigação mais profunda.

Os percentuais de necrose e apoptose indicam que NP-TiO₂ têm um alto potencial para causar a morte celular. Além disso, ficou evidente que as NP-TiO₂ interagiram com o DNA causando fragmentação do material genético e danos mutagênicos irreversíveis em células ZF-L.

REFERÊNCIAS

ARORA, S.; RAJWADE, J. M.; PAKNIKAR, K. M. Nanotoxicology and in vitro studies: The need of the hour. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 258, n. 2, p. 151–165, jan. 2012.

ASHARANI, P. V.; MUN, G. L. K.; HANDE, M. P.; VALIYAVEETTIL, S. Cytotoxicity and Genotoxicity of Silver Nanoparticles in Human Cells. **ACS Nano**, v. 3, n. 2, p. 279–290, 24 fev. 2009.

AUFFAN, M.; PEDEUTOUR, M.; ROSE, J.; MASON, A.; ZIARELLI, F.; BORSCHNECK, D.; CHANEAC, C.; BOTTA, C.; PERRINE, C.; LABILLE, J.; BOTTERO, J. Y. Structural Degradation at the Surface of a TiO₂-Based Nanomaterial Used in Cosmetics. **Environmental Science & Technology**, v. 44, n. 7, p. 2689–2694, abr. 2010.

BABICH, H.; BORENFREUND, E. Cytotoxicity and genotoxicity assays with cultured fish cells: A review. **Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA**, v. 5, n. 1, p. 91–100, 1991.

BARBAZUK, W. B. The Syntenic Relationship of the Zebrafish and Human Genomes. **Genome Research**, v. 10, n. 9, p. 1351–1358, 1 set. 2000.

BCC RESEARCH NANOTECHNOLOGY REPORT. **Global Markets for Nanocomposites, Nanoparticles, Nanoclays, and Nanotubes - NAN021F**. Disponível em: <<http://www.bccresearch.com/market-research/nanotechnology/nanocomposites-market-nan021f.html>>. Acesso em: 15 out. 2016.

BOLS, N. C.; DAYEH, V. R.; LEE, L. E. J.; SCHIRMER, K. Chapter 2 Use of fish cell lines in the toxicology and ecotoxicology of fish. Piscine cell lines in environmental toxicology. In: **Biochemistry and Molecular Biology of Fishes**. [s.l.] Elsevier, 2005. v. 6p. 43–84.

BOLS, N. C.; LEE, L. E. Technology and uses of cell cultures from the tissues and organs of bony fish. **Cytotechnology**, v. 6, n. 3, p. 163–187, jul. 1991.

BRANDÃO, F. D. **Esquema representativo das formas mais comuns de NP-TiO₂**. Belo Horizonte-MG, 2008. 130 p., il.

BRAS, M.; QUEENAN, B.; SUSIN, S. A. Programmed cell death via mitochondria: Different modes of dying. **Biochemistry (Moscow)**, v. 70, n. 2, p. 231–239, fev. 2005.

BYSTRZEJEWSKA-PIOTROWSKA, G.; GOLIMOWSKI, J.; URBAN, P. L. Nanoparticles: Their potential toxicity, waste and environmental management. **Waste Management**, v. 29, n. 9, p. 2587–2595, set. 2009.

CASCIOLA-ROSEN, L.; ROSEN, A.; PETRI, M.; SCHLISSEL, M. Surface blebs on apoptotic cells are sites of enhanced procoagulant activity: implications for coagulation events and antigenic spread in systemic lupus erythematosus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 4, p. 1624–1629, 20 fev. 1996.

CASTAÑEDA, L.; ALONSO, J. C.; ORTIZ, A.; ANDRADE, E.; SANIGER, J. M.; BAÑUELOS, J. G. Spray pyrolysis deposition and characterization of titanium oxide thin films. **Materials Chemistry and Physics**, v. 77, n. 3, p. 938–944, jan. 2003.

CAVALCANTE, D. G. M. **Esquema da utilização de linhagens celulares de peixes como modelos experimentais na ecotoxicologia**. Rio Claro-SP, 2012. 153 p., il.

Cell spotting – let’s fight cancer together! | www.scienceinschool.org. Disponível em: <<http://www.scienceinschool.org/content/cell-spotting-%E2%80%93-let%E2%80%99s-fight-cancer-together>>. Acesso em: 16 nov. 2016.

CERRADA, M. L.; SERRANO, C.; SÁNCHEZ-CHAVES, M.; FERNÁNDEZ-GARCÍA, M.; FERNÁNDEZ-MARTÍN, F.; ANDRÉS, A.; RIOBÓO, R. J. J.; KUBACKA, A.; FERRER, M.; FERNÁNDEZ-GARCÍA, M. et al. Self-Sterilized EVOH-TiO₂ Nanocomposites: Interface Effects on Biocidal Properties. **Advanced Functional Materials**, v. 18, n. 13, p. 1949–1960, 9 jul. 2008.

CHATTERJEE, D. K.; DIAGARADJANE, P.; KRISHNAN, S. Nanoparticle-mediated hyperthermia in cancer therapy. **Therapeutic Delivery**, v. 2, n. 8, p. 1001–1014, ago. 2011.

CHATTERJEE, R. The continuing uncertainty of nano risks and regulations. **Environmental Science & Technology**, v. 42, n. 21, p. 7733–7733, nov. 2008.

CHEKENI, F. B.; ELLIOTT, M. R.; SANDILOS, J. K.; WALK, S. F.; KINCHEN, J. M.; LAZAROWSKI, E. R.; ARMSTRONG, A. J.; PENUELA, S.; LAIRD, D. W.; SALVESENS, G. S.; ISAKSONS, B. E.; BAYLISS, D. A.; RAVICHANDRAN, K. S. Pannexin 1 channels mediate “find-me” signal release and membrane permeability during apoptosis. **Nature**, v. 467, n. 7317, p. 863–867, 14 out. 2010.

CHEN, M.; VONMIKECZ, A. Formation of nucleoplasmic protein aggregates impairs nuclear function in response to SiO nanoparticles. **Experimental Cell Research**, v. 305, n. 1, p. 51–62, 15 abr. 2005.

CHOI, J. E.; KIM, S.; AHN, J. H.; YOUN, P.; KANG, J. S.; PARK, K.; YI, J.; RYU, D. Y. Induction of oxidative stress and apoptosis by silver nanoparticles in the liver of adult zebrafish. **Aquatic Toxicology**, v. 100, n. 2, p. 151–159, out. 2010.

DAVID, L.; MOLDOVAN, B.; VULCU, A.; OLENI, L.; PERDE-SCHREPLER, M.; FISCHER-FODOR, E.; FLOREA, A.; CRISAN, M.; CHIOREAN, L.; CLICHICI, S.; FILIP, G. A. Green synthesis, characterization and anti-inflammatory activity of silver nanoparticles using European black elderberry fruits extract. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 122, p. 767–777, out. 2014.

DESAGHER, S.; MARTINOU, J. C. Mitochondria as the central control point of apoptosis. **Trends in Cell Biology**, v. 10, n. 9, p. 369–377, set. 2000.

DI VIRGILIO, A. L.; REIGOSA, M.; ARNAL, P. M.; MELE, M. F. L. Comparative study of the cytotoxic and genotoxic effects of titanium oxide and aluminium oxide nanoparticles in Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells. **Journal of Hazardous Materials**, v. 177, n. 1–3, p. 711–718, may 2010.

EIDE, M.; RUSTEN, M.; MALE, R.; JENSEN, K. H. M.; GOKSØYR, A. A characterization of the ZFL cell line and primary hepatocytes as in vitro liver cell models for the zebrafish (*Danio rerio*). **Aquatic Toxicology**, v. 147, p. 7–17, fev. 2014.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, v. 455, n. 1–2, p. 81–95, 20 nov. 2000.

FENT, K. Fish cell lines as versatile tools in ecotoxicology: assessment of cytotoxicity, cytochrome P4501A induction potential and estrogenic activity of chemicals and environmental samples. **Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA**, v. 15, n. 4–5, p. 477–488, out. 2001.

FENT, K. Permanent fish cell cultures as important tools in ecotoxicology. **ALTEX**, v. 24 Spec No, p. 26–28, 2007.

GHOSH, C.; ZHOU, Y. L.; COLLODI, P. Derivation and characterization of a zebrafish liver cell line. **Cell Biology and Toxicology**, v. 10, n. 3, p. 167–176, jun. 1994.

GHOSH, M.; CHAKRABORTY, A.; MUKHERJEE, A. Cytotoxic, genotoxic and the hemolytic effect of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles on human erythrocyte and lymphocyte cells *in vitro*: Hematotoxicity of TiO₂ nanoparticles. **Journal of Applied Toxicology**, v. 33, n. 10, p. 1097–1110, out. 2013.

GONZALEZ, L.; LISON, D.; KIRSCH-VOLDERS, M. Genotoxicity of engineered nanomaterials: A critical review. **Nanotoxicology**, v. 2, n. 4, p. 252–273, jan. 2008.

GULLEDGE, W. P. Letter to the Editor. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 634, n. 1–2, p. 241–242, dez. 2007.

HANDY, R. D.; VON DER KAMMER, F.; LEAD, J. R.; HASSELLÖV, M.; OWEN, R.; CRANE, M. The ecotoxicology and chemistry of manufactured nanoparticles. **Ecotoxicology**, v. 17, n. 4, p. 287–314, maio 2008a.

HANDY, R. D.; HENRY, T. B.; SCOW, T. M.; JOHNSTON, B. D.; TYLER, C. R. Manufactured nanoparticles: their uptake and effects on fish—a mechanistic analysis. **Ecotoxicology**, v. 17, n. 5, p. 396–409, jul. 2008b.

HE. **Cancer and inflammation studies using zebrafish cells**. S.l.: s.n., 2010.

HUANG, Y.-W.; WU, C.; ARONSTAM, R. S. Toxicity of Transition Metal Oxide Nanoparticles: Recent Insights from *in vitro* Studies. **Materials**, v. 3, n. 10, p. 4842–4859, 25 out. 2010.

Impact of Manufactured Nanomaterials (Metal and Metal oxides) on the Environment | Grassian Research Group | Department of Chemistry | College of

Liberal Arts and Sciences | The University of Iowa. Disponível em: <<https://chem.uiowa.edu/grassian-research-group/impact-manufactured-nanomaterials-metal-and-metal-oxides-the-environment>>. Acesso em: 16 nov. 2016.

JI, Z.; JIN, X.; GEORGE, S.; XIA, T.; MENG, H.; WANG, X.; SUAREZ, E.; ZHANG, H.; HOEK, E. M. V.; GODWIN, H.; NEL, A. E.; ZINK, J. I. Dispersion and Stability Optimization of TiO₂ Nanoparticles in Cell Culture Media. **Environmental Science & Technology**, v. 44, n. 19, p. 7309–7314, out. 2010.

KARLSSON, H. L. The comet assay in nanotoxicology research. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 398, n. 2, p. 651–666, set. 2010.

KISER, M. A.; WESTERHOFF, P.; BENN, T.; WANG, Y.; PÉREZ-RIVERA, J.; HRISTOVSKI, K. Titanium Nanomaterial Removal and Release from Wastewater Treatment Plants. **Environmental Science & Technology**, v. 43, n. 17, p. 6757–6763, set. 2009.

LEE, L. E. J.; DAYEH, V. R.; SCHIRMER, K.; BOLS, N. C. Applications and potential uses of fish gill cell lines: examples with RTgill-W1. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal**, v. 45, n. 3–4, p. 127–134, abr. 2009.

LIN, M. T.; BEAL, M. F. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Nature**, v. 443, n. 7113, p. 787–795, 19 out. 2006.

LIU, S.; XU, L.; ZHANG, T.; REN, G.; YANG, Z. Oxidative stress and apoptosis induced by nanosized titanium dioxide in PC12 cells. **Toxicology**, v. 267, n. 1–3, p. 172–177, jan. 2010.

LUI, P. P. Y.; CHEUK, Y. C.; HUNG, L. K.; FU, S. C.; CHAN, K. M. Increased apoptosis at the late stage of tendon healing. **Wound Repair and Regeneration**, v. 15, n. 5, p. 702–707, set. 2007.

MASCIANGIOLI, T.; ZHANG, W.-X. Environmental technologies at the nanoscale. **Environmental Science & Technology**, v. 37, n. 5, p. 102A–108A, 1 mar. 2003.

MELQUIADES, F. L.; FERREIRA, D. D.; APPOLONI, C. R.; LOPES, F.; LONNI, A. G.; OLIVEIRA, F. M.; DUARTE, J. C. Titanium dioxide determination in sunscreen by

energy dispersive X-ray fluorescence methodology. **Analytica Chimica Acta**, v. 613, n. 2, p. 135–143, abr. 2008.

MIRANDA, C. L.; COLLODI, P.; ZHAO, X.; BARNES, D. W.; BUHLER, D. R. Regulation of cytochrome P450 expression in a novel liver cell line from zebrafish (*Brachydanio rerio*). **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 305, n. 2, p. 320–327, set. 1993.

MIZUSHIMA, N.; YOSHIMORI, T.; OHSUMI, Y. The Role of Atg Proteins in Autophagosome Formation. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 27, n. 1, p. 107–132, 10 nov. 2011.

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, dez. 1983.

PARK, E.-J.; YI, J.; CHUNG, K.-H.; RYU, D.-Y.; CHOI, J.; PARK, K. Oxidative stress and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. **Toxicology Letters**, v. 180, n. 3, p. 222–229, ago. 2008.

PASCHOALINO, M. P.; MARCONE, G. P. S.; JARDIM, W. F. Os nanomateriais e a questão ambiental. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 421–430, 2010.

PETKOVIĆ, J.; ZEGURA, B.; STEVANOVIC, M.; DRNOVSEK, N.; USKOKOVIC, D.; NOVAK, S.; FILIPIC, M. DNA damage and alterations in expression of DNA damage responsive genes induced by TiO₂ nanoparticles in human hepatoma HepG2 cells. **Nanotoxicology**, v. 5, n. 3, p. 341–353, set. 2011.

POWERS, D. A. Fish as model systems. **Science (New York, N.Y.)**, v. 246, n. 4928, p. 352–358, 20 out. 1989.

REEVES, J. F.; DAVIES, S. J.; DODD, N. J. F.; JHA, A. N. Hydroxyl radicals (OH) are associated with titanium dioxide (TiO₂) nanoparticle-induced cytotoxicity and oxidative DNA damage in fish cells. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 640, n. 1–2, p. 113–122, abr. 2008.

REPETTO, G.; DEL PESO, A.; ZURITA, J. L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. **Nature Protocols**, v. 3, n. 7, p. 1125–1131, jun. 2008.

SAUER, U. G.; AUMANN, A.; MA-HOCK, L.; LANDSIEDEL, R.; WOHLLEBEN, W. Influence of dispersive agent on nanomaterial agglomeration and implications for biological effects in vivo or in vitro. **Toxicology in Vitro**, v. 29, n. 1, p. 182–186, fev. 2015.

SCHAEFER, J.; SCHULZE, C.; MARXER, E. E. J.; SCHAEFER, U. F.; WOHLLEBEN, W.; BAKOWSKY, U.; LEHR, C.-M. Atomic Force Microscopy and Analytical Ultracentrifugation for Probing Nanomaterial Protein Interactions. **ACS Nano**, v. 6, n. 6, p. 4603–4614, 26 jun. 2012.

SCOWN, T. M.; VAN AERLE, R.; JOHNSTON, B. D.; CUMBERLAND, S.; LEAD, J. R.; OWEN, R.; TYLER, C. R. High Doses of Intravenously Administered Titanium Dioxide Nanoparticles Accumulate in the Kidneys of Rainbow Trout but with no Observable Impairment of Renal Function. **Toxicological Sciences**, v. 109, n. 2, p. 372–380, 1 jun. 2009.

SEGALA, K. **Segmentos que utilizam materiais em nanoescala**. Florianópolis-SC, 2009. 229 p., il.

SERPONE, N.; DONDI, D.; ALBINI, A. Inorganic and organic UV filters: Their role and efficacy in sunscreens and suncare products. **Inorganica Chimica Acta**, v. 360, n. 3, p. 794–802, fev. 2007.

SHI, H.; MAGAYE, R.; CASTRANOVA, V.; ZHAO, J. Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 10, p. 15, 2013.

SHI, Y.; WANG, F.; HE, J.; YADAV, S.; WANG, H. Titanium dioxide nanoparticles cause apoptosis in BEAS-2B cells through the caspase 8/t-Bid-independent mitochondrial pathway. **Toxicology Letters**, v. 196, n. 1, p. 21–27, jun. 2010.

SIMON-DECKERS, A.; GOUGET, B.; MAYNE-L'HERMITE, M.; HERLIN-BOIME, N.; REYNAUD, C.; CARRIÈRE, M. 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, nov. 2008.

SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, n. 1, p. 184–191, mar. 1988.

SRIVASTAVA, V.; GUSAIN, D.; SHARMA, Y. C. Critical Review on the Toxicity of Some Widely Used Engineered Nanoparticles. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 54, n. 24, p. 6209–6233, 24 jun. 2015.

STROBER, W. Trypan blue exclusion test of cell viability. **Current Protocols in Immunology / Edited by John E. Coligan ... [et Al.]**, v. Appendix 3, p. Appendix 3B, maio 2001.

SUTARIYA, V. B.; PATHAK, Y. (EDS.). **Bio-interactions of nanomaterials**. Boca Raton, FL: CRC Press, 2014.

SYLVESTER, P. W. Optimization of the Tetrazolium Dye (MTT) Colorimetric Assay for Cellular Growth and Viability. In: SATYANARAYANAJOIS, S. D. (Ed.). **Drug Design and Discovery**. Totowa, NJ: Humana Press, 2011. v. 716p. 157–168.

TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLISON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J.-C.; SASAKI, Y. F. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, n. 3, p. 206–221, 2000.

TORRES-TORRES, D.; TREJO-VALDEZ, M.; CASTAÑEDA, L.; TORRES-TORRES, C.; TAMAYO-RIVERA, L.; FERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, R. C.; REYES-ESQUEDA, J. A.; MUÑOZ-SALDAÑA, J.; RANGEL-ROJO, R.; OLIVER, A. Inhibition of the two-photon absorption response exhibited by a bilayer TiO₂ film with embedded Au nanoparticles. **Optics Express**, v. 18, n. 16, p. 16406–16417, 2 ago. 2010.

VAMANU, C. I.; CIMPAN, M. R.; HØL, P. J.; SØRNES, S.; LIE, S. A.; GJERDET, N. R. Induction of cell death by TiO₂ nanoparticles: Studies on a human monoblastoid cell line. **Toxicology in Vitro**, v. 22, n. 7, p. 1689–1696, out. 2008.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, n. 2, p. 57–149, fev. 2003.

VAN ENGELAND, M.; RAMAEKERS, F. C. S.; SCHUTTE, B.; REUTELINGSPERGER, C. P. M. A novel assay to measure loss of plasma membrane asymmetry during apoptosis of adherent cells in culture. **Cytometry**, v. 24, n. 2, p. 131–139, 1 jun. 1996.

VEVERS, W. F.; JHA, A. N. Genotoxic and cytotoxic potential of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles on fish cells in vitro. **Ecotoxicology**, v. 17, n. 5, p. 410–420, jul. 2008.

WANG, S.; YU, H.; WICKLIFFE, J. K. Limitation of the MTT and XTT assays for measuring cell viability due to superoxide formation induced by nano-scale TiO₂. **Toxicology in Vitro**, v. 25, n. 8, p. 2147–2151, dez. 2011.

WANG, Y.; AKER, W. G.; HWANG, H.-M.; YEDJOU, C. G.; YU, H.; TCHOUNWOU, P. B. A study of the mechanism of in vitro cytotoxicity of metal oxide nanoparticles using catfish primary hepatocytes and human HepG2 cells. **Science of The Total Environment**, v. 409, n. 22, p. 4753–4762, out. 2011.

WEIR, A.; WESTERHOFF, P.; FABRICIUS, L.; HRISTOVSKI, K.; VON GOETZ, N. Titanium Dioxide Nanoparticles in Food and Personal Care Products. **Environmental Science & Technology**, v. 46, n. 4, p. 2242–2250, 21 fev. 2012.

WESTERHOFF, P.; SONG, G.; HRISTOVSKI, K.; KISER, M. A. Occurrence and removal of titanium at full scale wastewater treatment plants: implications for TiO₂ nanomaterials. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 13, n. 5, p. 1195, 2011.

XIE, Z.; KLIONSKY, D. J. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. **Nature Cell Biology**, v. 9, n. 10, p. 1102–1109, out. 2007.

XUE, C.; WU, J.; LAN, F.; LIU, W.; YANG, X.; ZENG, F.; XU, H. Nano Titanium Dioxide Induces the Generation of ROS and Potential Damage in HaCaT Cells Under UVA Irradiation. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 10, n. 12, p. 8500–8507, 1 dez. 2010.

ZHANG, Z.; YUAN, Y.; FANG, Y.; LIANG, L.; DING, H.; JIN, L. Preparation of photocatalytic nano-ZnO/TiO₂ film and application for determination of chemical oxygen demand. **Talanta**, v. 73, n. 3, p. 523–528, 30 set. 2007.