

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

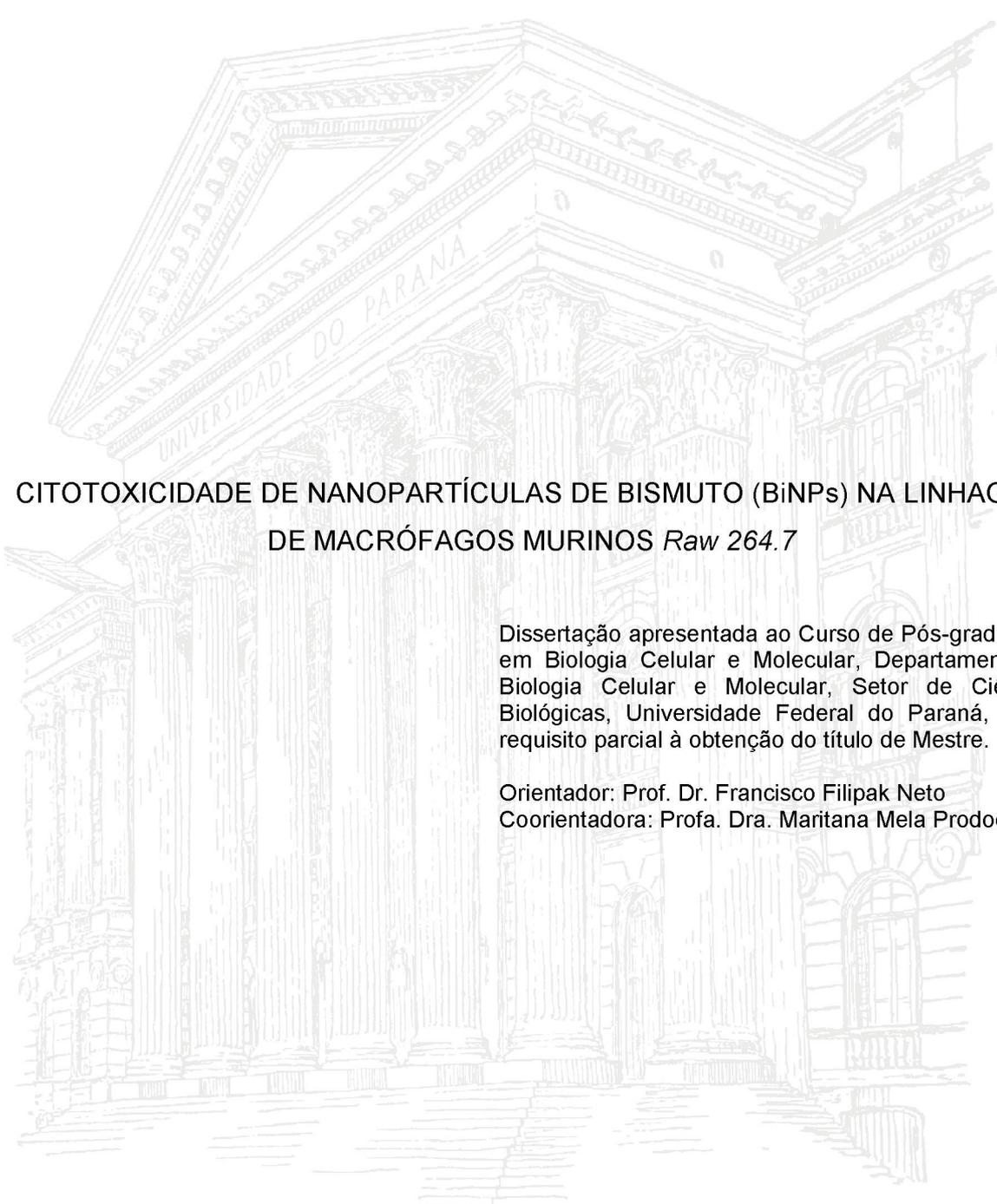
JESSICA ZABLOCKI DA LUZ

CITOTOXICIDADE DE NANOPARTÍCULAS DE BISMUTO (BiNPs) NA LINHAGEM
DE MACRÓFAGOS MURINOS *Raw 264.7*

CURITIBA

2019

JESSICA ZABLOCKI DA LUZ



CITOTOXICIDADE DE NANOPARTÍCULAS DE BISMUTO (BiNPs) NA LINHAGEM
DE MACRÓFAGOS MURINOS *Raw 264.7*

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Departamento de Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Filipak Neto
Coorientadora: Profa. Dra. Maritana Mela Prodocimo

CURITIBA

2019

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Luz, Jessica Zablocki da

Citotoxicidade de nanopartículas de bismuto (BiNPs) na linhagem de macrófagos murinos *Raw 264.7*. / Jessica Zablocki da Luz. – Curitiba, 2019.

45 p.: il.

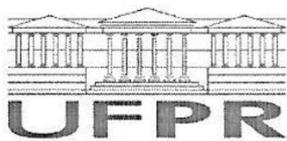
Orientador: Franciso Filipak Neto

Coorientador: Maritana Mela Prodocimo

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

1. Nanopartículas 2. Macrófagos 3. Bismuto - Toxicidade I. Título II. Filipak Neto, Franciso III. Prodocimo, Maritana Mela IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

CDD (22. ed.) 546.718



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR - 40001016007P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **JESSICA ZABLOCKI DA LUZ** intitulada: **Citotoxicidade de nanopartículas de bismuto (BiNPs) na linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 22 de Fevereiro de 2019.

Francisco Filipak Neto
FRANCISCO FILIPAK NETO

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

Larissa Vuitika
LARISSA VUITIKA

Avaliador Interno Pós-Doc (UFPR)

Alessandra Melo de Aguiar
ALESSANDRA MELO DE AGUIAR

Avaliador Interno (ICC)



AGRADECIMENTOS

Ao prof. Francisco, pelos quatro anos de orientação, sendo para mim um dos maiores exemplos de dedicação, ética e conduta na pesquisa e ensino.

Aos demais professores que conduzem o grupo de pesquisa em toxicologia celular, pelo trabalho exemplar, por buscarem ser sempre justos, pela prontidão em ajudar e pela dedicação em conseguir os recursos necessários à continuidade das pesquisas.

Aos colegas de laboratório, por toda contribuição no desenvolvimento dessa pesquisa. Em especial à Yvanna, que me acolheu assim que iniciei a iniciação científica, me dando toda a base técnica de cultivo celular e dos principais ensaios citotóxicológicos. Também à Gisleine, Micheli e Fernanda, que nesses últimos dois anos dividiram comigo toda a insegurança e ansiedade inerentes à pós-graduação.

Ao Thiago e Arandi do Laboratório Fotonanobio da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, pela colaboração com a síntese e caracterização das nanopartículas.

Aos funcionários técnicos e administrativos da universidade. Em especial aos técnicos do Centro de Tecnologias Avançadas em Fluorescência (CTAF) Israel, Liz e Alessandra.

Aos laboratórios de Matriz Extracelular e Biotecnologia de Venenos e de Investigação de Polissacarídeos Sulfatados do departamento de Biologia Celular da universidade, que contribuíram com empréstimo de equipamento e/ou reagente.

Ao Alex, aluno de doutorado no PPG em Bioquímica e Biologia Molecular da universidade, pelo auxílio com a análise de ciclo celular.

Às agências fomentadoras, principalmente ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa.

Aos meus pais, Marlei e Hélia, por construírem juntos a nossa família, com ideais e valores que foram os maiores responsáveis pelo que eu e meus irmãos/melhores amigos, Janaina e Eliton, somos hoje.

Às amigas Lucienne e Bruna, que nesse último ano foram a segunda família para mim e minha irmã. Também à esta, Janaina, por dividir tudo comigo: aflições, alegrias e até quarto, me dando um suporte emocional importantíssimo.

Por fim, à todo meu círculo social, que como descreve o provérbio zulu "Umuntu Ngumuntu Ngabantu" ou traduzindo "sou porque somos", me faz ser quem sou.

*The most exciting phrase to hear in science, the
one that heralds new discoveries, is not 'Eureka!'
but 'That's funny...'*

Isaac Asimov

RESUMO

Nanopartículas (NPs) vêm sendo amplamente utilizadas devido ao avanço da nanotecnologia nas duas últimas décadas. Dentre as NPs metálicas, as de bismuto (BiNPs) tem se mostrado promissoras para diferentes aplicações biomédicas. Um passo crucial antes de serem de fato aplicadas é a investigação toxicológica. Ainda que a compreensão das possíveis consequências toxicológicas das BiNPs esteja em fase inicial, estudos já vêm mostrando que essas partículas podem iniciar toxicidade a nível subcelular, celular e tecidual em diversos modelos experimentais. Possíveis efeitos tóxicos de BiNPs poderiam estar relacionados ao sistema imunológico, visto que já foi descrito efeito imunomodulatório por NPs. A linhagem de macrófagos murinos *Raw 264.7* foi utilizada neste estudo para avaliar a citotoxicidade de BiNPs. As BiNPs foram sintetizadas pelo método físico de ablação à laser em meio líquido (LASiS) e então caracterizadas por meio das técnicas de espectroscopia ultravioleta-visível (UV-Vis) e espalhamento dinâmico de luz (DSL). As células foram cultivadas em meio DMEM alta glicose suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e antibióticos. Os ensaios para avaliar a citotoxicidade das BiNPs foram divididos em 3 categorias: investigação de citotoxicidade inespecífica (MTT, cristal violeta e azul de tripan), específica (atividade fagocítica, produção de espécies reativas de oxigênio, EROs e nitrogênio, ERNs) e relacionada a mecanismos celulares (danos no DNA). As células *Raw 264.7* foram expostas à BiNPs em concentrações de 0,01-50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. As BiNPs apresentaram formato esférico e uma ampla faixa de distribuição de tamanho (maior prevalência entre 35 nm e 45 nm, chegando até a 170 nm). As células *Raw 264.7*, quando expostas à 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de BiNPs, tiveram parâmetros alterados, como redução na capacidade de converter MTT em formazan, redução na adesão celular e aumento da capacidade fagocítica. Contudo, não houve rupturas na membrana, redução da proliferação e nem alterações nos níveis de EROs e ERNs nas células expostas. Como a capacidade fagocítica aumentou consideravelmente tanto em 24 quanto em 48 h de exposição à 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, esse estudo sugere que as BiNPs podem causar imunotoxicidade ao influenciar em respostas principalmente pró-inflamatórias, o que reforça a importância da busca pela compreensão dos mecanismos toxicológicos antes da aplicação biomédica dessas NPs.

Palavras-chave: Nanopartículas, Bismuto, Macrófago, *Raw 264.7*, Citotoxicidade.

ABSTRACT

Nanoparticles (NPs) have been widely used due to advance of nanotechnology in the last two decades. Among metal NPs, bismuth NPs (BiNPs) are promising for different biomedical applications. Toxicological investigation is a crucial step before application of NPs in the market, and although the understanding of possible toxicological consequences of BiNPs is at early stage, studies have already shown that these particles can initiate subcellular, cellular and tissue toxicity in several experimental models. Possible toxic effects of BiNPs may be related to the immune system, since immunomodulatory effects of NPs have already been described. The murine macrophage cell line Raw 264.7 was used in this study to evaluate the cytotoxicity of BiNPs. BiNPs were synthesized by the physical method of laser ablation synthesis in solution (LASiS) and then characterized by the techniques of ultraviolet-visible (UV-Vis) spectroscopy and dynamic light scattering (DSL). Cells were cultured in high glucose DMEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and antibiotics. The assays to evaluate the cytotoxicity of BiNPs were divided into 3 categories: investigation of non-specific cytotoxicity (MTT, crystal violet and trypan blue), investigation of specific cytotoxicity (phagocytic activity, production of reactive oxygen (ROS) and nitrogen species (RNS)) and related to the cellular mechanisms (DNA damage). The Raw 264.7 cells were exposed to BiNPs at concentrations of 0.01-50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. The BiNPs were spherical in shape and had wide size distribution range (higher prevalence between 25 nm and 60 nm, up to 170 nm). When exposed to 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ of BiNPs, cells had altered parameters, such as reduction of the ability to convert MTT to formazan, decrease of cell adhesion and increase of phagocytic capacity. However, there were no significant ruptures of the plasma membrane, reduction of proliferation or changes in the levels of ROS and RNS in the exposed cells. Due to the considerable increase in phagocytic activity in both 24 and 48 h of exposure to 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, this study suggests that BiNPs may cause immunotoxicity by influencing mainly proinflammatory responses, which reinforces the importance of research for the understanding of the toxicological mechanisms before the biomedical application of these NPs.

Keywords: Nanoparticles, Bismuth, Macrophage, Raw 264.7, Cytotoxicity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. NPs encontradas na composição dos produtos nanotecnológicos	12
Figura 2. Esquema representativo dos possíveis efeitos imunotoxicos de NPs.....	13
Figura 3. Fotomicrografia de células da linhagem <i>Raw 264.7</i>	16
Figura 4. Esquema da montagem utilizada para realização da ablação a laser.	19
Gráfico 1. Espectro de absorção UV-Vis.....	27
Gráfico 2. Histograma DLS	27
Gráfico 4. Conversão do MTT em formazan	29
Gráfico 5. Interferência de peróxido de hidrogênio no ensaio do MTT	29
Gráfico 6. Relação MTT/cristal violeta.....	30
Gráfico 7. Quantidade de células aderidas	31
Figura 5. Células <i>Raw 264.7</i> coradas com cristal violeta.....	31
Gráfico 8. Viabilidade celular	32
Figura 6. Células <i>Raw 264.7</i> incubadas com azul de tripan	32
Gráfico 9. Distribuição das células nas fases do ciclo celular.....	33
Gráfico 10. Índice fagocítico.....	34
Figura 7. Células <i>Raw 264.7</i> incubadas por 2 h com leveduras	35
Gráfico 11. Níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs).	36
Gráfico 12. Níveis de espécies reativas de nitrogênio (ERNs)	37
Gráfico 13. Danos no DNA.....	38
Figura 8. Células <i>Raw 264.7</i> e focos de reparo de danos no DNA.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ATCC – *American type culture collection*
- ATM – *Ataxia telangiectasia mutated*
- BCRJ – Banco de células do Rio de Janeiro
- Bi – Bismuto
- BiNP – Nanopartícula de bismuto
- BSA – Albumina de soro bovino
- CAT – Catalase
- CPI – *Nanotechnology consumer products inventory*
- CR – receptor de complemento
- DAN – 2,3-diaminonaftaleno
- DCF – 2,7-diclorodihidrofluoresceína diacetato
- DLS – *Dynamic light scattering*
- DMEM – *Dulbecco's minimum essential medium*
- DMSO – Dimetilsulfóxido
- DNA – *Deoxyribonucleic acid*
- EDTA – *Ethylenediamine tetraacetic acid*
- EPA – *Environmental protection agency*
- ERNs – Espécies reativas de nitrogênio
- EROs – Espécies reativas de oxigênio
- FcγR – receptor de Fcγ
- GSH – Glutathione
- LASiS – *Laser ablation synthesis in solution*
- MET – Microscopia eletrônica de transmissão
- MR – receptor de manose
- MTT – Brometo de 3-metil [4,5-dimetiltiazol-2il]-2,5 difeniltetrazólio
- NP – Nanopartícula
- PBS – *Phosphate-buffered saline*
- PI – *Propidium iodide*
- SFB – Soro fetal bovino
- SOD – Superóxido dismutase
- SP-D – proteína surfactante-D
- TLRs – receptores *Toll-like*
- UV-Vis – *Ultraviolet-visible*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1	NANOPARTÍCULAS	12
2.2	NANOPARTÍCULAS E SISTEMA IMUNOLÓGICO	13
2.3	CORONA PROTEICA E ESTABILIZAÇÃO DE SOLUÇÕES COLOIDAIIS DE NPs	13
2.4	NANOPARTÍCULAS DE BISMUTO	14
2.5	MACRÓFAGOS	15
2.6	LINHAGEM <i>Raw 264.7</i>	16
3	JUSTIFICATIVA	17
4	HIPÓTESE	17
5	OBJETIVO GERAL	17
5.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
6	MATERIAL E MÉTODOS	18
6.1	CULTIVO DAS CÉLULAS DA LINHAGEM <i>Raw 264.7</i>	18
6.2	SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS	18
6.2.1	UV-Vis	19
6.2.2	Espalhamento dinâmico de luz (DLS)	20
6.3	GRUPOS EXPERIMENTAIS	20
6.4	INVESTIGAÇÃO DE CITOTOXICIDADE INESPECÍFICA	20
6.4.1	Ensaio do MTT	20
6.4.2	Ensaio do cristal violeta	21
6.4.3	Ensaio do azul de tripan	22
6.4.4	Ciclo celular	22
6.5	INVESTIGAÇÃO DA CITOTOXICIDADE ESPECÍFICA	23
6.5.1	Atividade fagocítica	23
6.5.2	Produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)	24
6.5.3	Produção de espécies reativas de nitrogênio (ERNs)	24
6.6	INVESTIGAÇÃO DE CITOTOXICIDADE RELACIONADA A MECANISMOS CELULARES	25
6.6.1	Danos no DNA	25
6.7	TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS	26
7	RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
7.1	CARACTERIZAÇÃO DAS BiNPs	26
7.1.1	UV-Vis	26
7.1.2	DLS	27
7.2	CITOTOXICIDADE INESPECÍFICA	28

7.2.1	Ensaio do MTT	28
7.2.2	Ensaio de cristal violeta	30
7.2.3	Ensaio de azul de tripan	32
7.2.4	Ciclo celular.....	33
7.3	CITOTOXICIDADE ESPECÍFICA	34
7.3.1	Atividade fagocítica.....	34
7.3.2	Níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs).....	36
7.3.3	Níveis de espécies reativas de nitrogênio (ERNs)	37
7.4	CITOTOXICIDADE RELACIONADA A MECANISMOS CELULARES.....	38
7.4.1	Danos no DNA.....	38
8	CONCLUSÃO	40
9	PERSPECTIVAS FUTURAS	40
10	REFERÊNCIAS	41

1 INTRODUÇÃO

As nanopartículas (NPs) vêm sendo amplamente utilizadas devido ao avanço da nanotecnologia nas últimas duas décadas, o que tem incitado cada vez mais o interesse pelo conhecimento das possíveis consequências toxicológicas (MADDEN e HOHELLA JR, 2005; EPA, 2007; VANCE *et al.*, 2015). Entre as NPs utilizadas, as metálicas têm destaque por estarem presentes em uma variedade de produtos nanotecnológicos (VANCE *et al.*, 2015).

Compostos de bismuto (Bi) já vêm sendo usados para fins industriais. Na indústria biomédica, por exemplo, são usados no tratamento de doenças gastrointestinais (SOX e OLSON, 1989; KEOGAN e GRIFFITH, 2014; MARCUS *et al.*, 2015; AKPINAR *et al.*, 2017). Em relação às BiNPs nenhum produto com essas NPs na composição foi comercializado até o momento (THE PROJECT ON EMERGING NANOTECHNOLOGIES, 2019), contudo há um número considerável de estudos indicando emprego das BiNPs ou NPs com Bi em diferentes aplicações biomédicas, como para diagnóstico por imagem, tratamento de câncer, carreamento de drogas e até mesmo em antissépticos bucais (HERNANDEZ-DELGADILLO *et al.*, 2013; KEOGAN e GRIFFITH, 2014; STEWART *et al.*, 2016; EL-BATAL *et al.*, 2017; HERNANDEZ-DELGADILLO *et al.*, 2017; DENG *et al.*, 2018; TORRISI *et al.*, 2018). Assim, avaliar os mecanismos de toxicidade de BiNPs é um passo crucial que deve preceder a aplicação na indústria biomédica. Apesar da compreensão das possíveis consequências toxicológicas das BiNPs estar em fase inicial, estudos já vêm mostrando que essas partículas podem iniciar toxicidade ao nível subcelular, celular e tecidual em diversos modelos experimentais. Foi verificada toxicidade em peixes adultos e ovos de *Danio rerio* (KOVRIŽNYCH *et al.*, 2013), além de diferentes efeitos citotóxicos nas linhagens *HepG2*¹, *NRK-52E*², *Caco-2*³, *A549*⁴, *Hek293*⁵ e *BALB/c 3T3*⁶ (ABUDAYYAK *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2017; REUS *et al.*, 2018), o que sugere possível toxicidade pulmonar, hepática e principalmente renal.

Uma diversidade de NPs foram descritas na literatura como tendo efeito imunomodulatório no organismo, causando imunotoxicidade ao favorecer respostas

¹ A linhagem *HepG2* tem origem de tecido hepático humano, isolada de um hepatocarcinoma.

² *NRK-52E* tem origem de tecido renal de rato.

³ *Caco-2* tem origem em tecido de cólon humano, isolada de um adenocarcinoma colorretal.

⁴ *A549* tem origem de tecido pulmonar humano, isolada de um carcinoma.

⁵ *Hek293* tem origem de tecido renal de embrião humano.

⁶ *BALB/c 3T3* tem origem de tecido embrionário de camundongo.

inflamatórias ou ao atuar na imunossupressão (PANDEY e PRAJAPATI, 2018) e um bom modelo para o estudo da imunotoxicidade de compostos e partículas, como as BiNPs, são os macrófagos, células fagocíticas que constituem a primeira linha de defesa contra agentes infecciosos (BABIOR, 2000). Sendo assim, o objetivo desse estudo foi de avaliar a citotoxicidade de BiNPs após exposição de macrófagos murinos *Raw 264.7* à estas NPs.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 NANOPARTÍCULAS

Nanopartículas (NPs) são materiais sólidos com tamanho em três dimensões maior que 1 nanômetro e menor que 100 nanômetros e que podem apresentar propriedades físicas e reatividade específicas em função do tamanho (MADDEN e HOHELLA JR, 2005). Nas duas últimas décadas, as NPs vêm sendo produzidas industrialmente e em larga escala graças ao desenvolvimento da nanotecnologia (MADDEN e HOHELLA JR, 2005; EPA, 2007; VANCE *et al.*, 2015; THE PROJECT ON EMERGING NANOTECHNOLOGIES, 2019).

Há uma grande variedade de NPs sendo desenvolvidas e aplicadas. Estas aplicações vão desde a indústria eletrônica, passando pela cosmética e têxtil, até a biomédica. O “*Nanotechnology Consumer Products Inventory*” (CPI), criado em 2005, enumera 1814 produtos contendo NPs de 622 empresas em 32 países (VANCE *et al.*, 2015). As NPs metálicas, categoria das BiNPs, destacam-se, estando presentes em mais de 600 produtos (Figura 1).

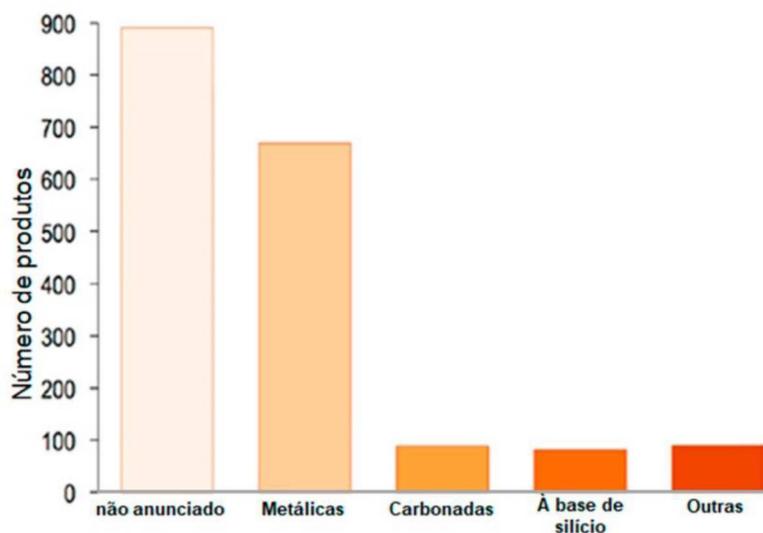


Figura 1. NPs encontradas na composição dos produtos nanotecnológicos listados no CPI, divididos em 5 grupos: não anunciado, nanopartículas metálicas, carbonadas, à base de silício e outras. Modificado de VANCE *et al.* (2015).

2.2 NANOPARTÍCULAS E SISTEMA IMUNOLÓGICO

Efeitos imunotóxicos de NPs estão relacionados à interação com células do sistema imunológico inato e adaptativo, podendo haver redução da viabilidade dessas células e aumento da secreção de quimiocinas e citocinas (Figura 2), o que pode favorecer respostas inflamatórias ou atuar na imunossupressão (PANDEY e PRAJAPATI, 2018).

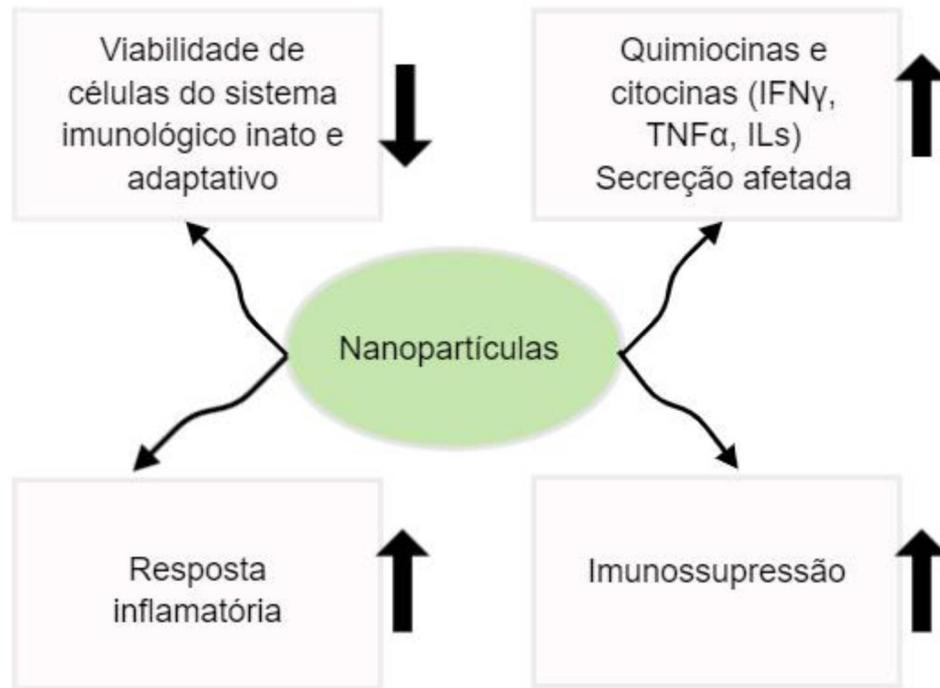


Figura 2. Esquema representativo dos possíveis efeitos imunotóxicos de NPs. Criado em mindthegraph.com a partir do esquema de PANDEY e PRAJAPATI (2018).

Manshian *et al.* (2018) explicam que diferentes tipos de NPs possuem propriedades imunomoduladoras dependendo de suas características físico-químicas, o que pode ser aproveitado no tratamento do câncer. Contudo, o estudo mostrou que a inflamação provocada por NPs pode ter influências negativas em condições fisiopatológicas, podendo, p. ex., aumentar a mobilidade e malignidade de células tumorais. Em muitos casos, o próprio estado de agregação, aglomeração e composição de coronas orgânicas na superfície das NPs podem afetar os efeitos.

2.3 CORONA PROTEICA E ESTABILIZAÇÃO DE SOLUÇÕES COLOIDAIS DE NPs

Uma das estratégias usadas para a estabilização de suspensões coloidais, quando as NPs tendem a agregar e precipitar, é adicionar à solução alguma

molécula orgânica, p. ex., albumina de soro bovino (BSA), tornando a suspensão mais estável por meio da adsorção à NP, conhecido como efeito corona (WU *et al.*, 2010; LIU *et al.*, 2017; REUS *et al.*, 2018).

Além disso, a adição de uma molécula orgânica à suspensão coloidal pode ser útil à aplicação biomédica, porque dependendo das características da NP, biomoléculas como proteínas do plasma e lipídios podem ser adsorvidas a elas. Imunoglobulina (IgG), imunoglobulina M (IgM) e fibrinogênio são algumas proteínas comuns detectadas na corona de quase todas as NPs metálicas quando em plasma sanguíneo. Essa opsonização, com essas biomoléculas específicas, auxilia na captação das NPs pelas células fagocíticas, resultando na remoção dessas NPs da circulação. Sendo assim a estabilização com alguma molécula orgânica pode ser uma alternativa para minimizar a fagocitose das NPs (NAM *et al.*, 2013; POMBO GARCÍA *et al.*, 2014; VINLUAN e ZHENG, 2015; DENG *et al.*, 2018).

2.4 NANOPARTÍCULAS DE BISMUTO

Por apresentarem eficácia antimicrobiana contra *Helicobacter pylori*, compostos de Bi vem sendo usados na medicina para o tratamento de doenças gastrointestinais como a gastrite (SOX e OLSON, 1989; KEOGAN e GRIFFITH, 2014; MARCUS *et al.*, 2015; AKPINAR *et al.*, 2017).

Apesar de não haver nenhum produto nanotecnológico com BiNPs na composição sendo comercializado até o momento (THE PROJECT ON EMERGING NANOTECHNOLOGIES, 2019), um número considerável de estudos vêm indicando as BiNPs e NPs contendo Bi como promissoras para diagnóstico por imagem (tomografia computadorizada), tratamento de câncer por meio de radioterapia (NPs radiosensibilizando as células tumorais) e termoquimioterapia, como nanocarreadores para entrega de medicamentos e até mesmo em antisséptico bucal devido a suas propriedades bactericida, anti-biofilme, fungicida e antiviral (HERNANDEZ-DELGADILLO *et al.*, 2013; KEOGAN e GRIFFITH, 2014; STEWART *et al.*, 2016; EL-BATAL *et al.*, 2017; HERNANDEZ-DELGADILLO *et al.*, 2017; DENG *et al.*, 2018; TORRISI *et al.*, 2018). Além disso, ao contrário de outras NPs, as BiNPs podem ser oxidadas e dissolvidas mais facilmente em condições fisiológicas e assim excretadas do organismo como moléculas solúveis (BROWN e GOFORTH, 2012; DENG *et al.*, 2018). Ademais, BiNPs também são atraentes para indústria devido ao

seu baixo custo em comparação com outras nanopartículas metálicas (CABRAL-ROMERO e SHANKARARAMAN, 2014).

Entretanto, é inevitável a preocupação em relação à toxicidade dessas partículas e compostos. Compostos de Bi já foram documentados como sendo nefrotóxicos para humanos, com relatos recentes de dano renal irreversível (IŞLEK *et al.*, 2001; ERDEN *et al.*, 2013). BiNPs foram documentadas como sendo citotóxicas em análises *in vivo* e principalmente *in vitro*. Em concentrações de 1 a 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ foi verificado que as BiNPs (síntese química) diminuem a viabilidade celular por interrupção nas funções mitocondrial e lisossômica nas células *HepG2*, *NRK-52E*, *Caco-2* e *A549* (ABUDAYYAK *et al.*, 2017). Além disso, apresentaram toxicidade em peixes adultos e ovos de *Danio rerio*, $\text{IC}_{50} = 1500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (KOVRIŽNYCH *et al.*, 2013) e citotoxicidade acentuada em *Hek293*, induzindo autofagia nessas células (LIU *et al.*, 2017), além de lesão renal temporária em camundongos, processo ligado à autofagia (LIU *et al.*, 2018).

Até então, apenas o estudo de Reus *et al.* (2018) buscou investigar a toxicidade de BiNPs sintetizadas por método físico. Reus *et al.* (2018) verificou que as BiNPs são internalizadas por células da linhagem *BALB/c 3T3*, apresentando efeitos citotóxicos concentração-dependente. As BiNPs foram internalizadas pelas células quando expostas a uma concentração equivalente a IC_{50} , de $\sim 30 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, o que pode causar danos ultraestruturais, possivelmente levando à morte celular.

Dessa forma, um passo crucial antes das BiNPs serem aplicadas na indústria biomédica é a melhor elucidação dos seus mecanismos de toxicidade, visto que os estudos que avaliam toxicidade ainda estão em fase inicial.

2.5 MACRÓFAGOS

As células fagocíticas como monócitos, neutrófilos, células dendríticas, células B e macrófagos podem ser encontradas no sangue, pele, mucosas e em vários órgãos como fígado, baço, linfonodos, pulmão e cérebro (PANDEY e PRAJAPATI, 2018). Os macrófagos derivam dos monócitos circulantes e são células mononucleares que residem nos tecidos e contribuem para a imunidade inata quando ativados por agentes infecciosos (KATO *et al.*, 1984). Atuam na secreção de mediadores inflamatórios, processamento e apresentação de antígenos às células do sistema imunológico adaptativo, além da reparação do tecido após a inflamação

(GRANATA *et al.*, 2006). Por constituírem a primeira linha de defesa contra agentes infecciosos (BABIOR, 2000), representam um modelo muito interessante para investigar se um composto é imunotóxico, isto é, se ele altera uma ou mais funções do sistema imunológico, por meio da imunossupressão ou imunoestimulação, resultando em um efeito adverso (DESCOTES, 2004). Além disso, os macrófagos são especializados em processos de endocitose, como pinocitose e fagocitose, considerados as principais vias de captação de NPs pelas células. Expressam diversos receptores que facilitam a captação pela ligação específica às opsoninas, moléculas com afinidade por esses receptores (REJMAN *et al.*, 2004; HILLAIREAU e COUVREUR, 2009; FERREIRA *et al.*, 2014).

2.6 LINHAGEM Raw 264.7

Dentre as linhagens estabelecidas de macrófagos disponíveis, a *Raw 264.7* destaca-se. São células aderentes (Figura 3), com alta taxa de proliferação, completando o ciclo celular em menos de 24 h, oriundas de células de tumor induzido por vírus (*Abelson Leukemia Virus*) em camundongo (*Mus musculus*) e que apresentam alta taxa de fagocitose, além de serem de fácil cultivo. São úteis para testes de citotoxicidade por apresentarem metabolismo semelhante ao de macrófagos de culturas primárias, mas como são de linhagem não apresentam taxa de declínio por senescência replicativa (RASCHKE *et al.*, 1978; ATCC, 2016).

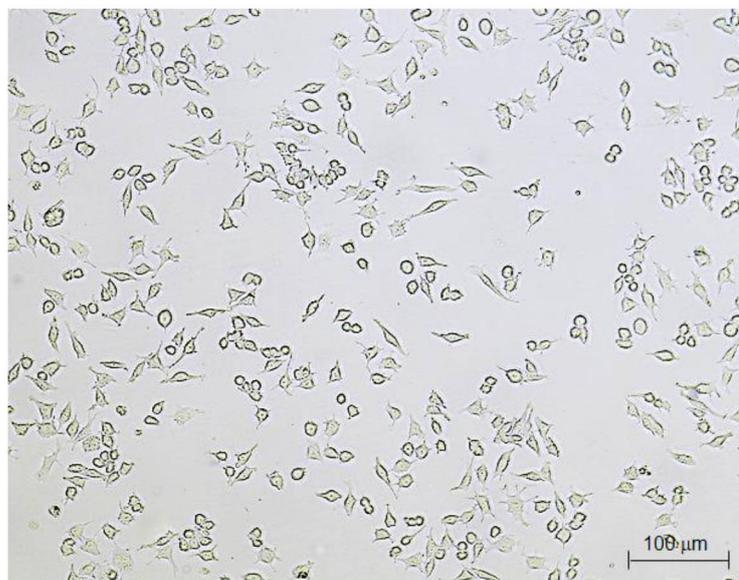


Figura 3. Fotomicrografia de células da linhagem *Raw 264.7* após 36 h em cultura sob microscópio invertido. FONTE: autora.

3 JUSTIFICATIVA

Compostos de Bi já são usados para o tratamento de doenças gastrointestinais e alguns estudos recentes vêm indicando NPs contendo Bi como promissoras para diagnóstico por imagem, tratamento de câncer e como carreadoras de drogas. Contudo, outros estudos mostram que as BiNPs podem ser tóxicas ao organismo. Diversas NPs são descritas na literatura como tendo efeito imunomodulatório, causando imunotoxicidade ao favorecer respostas inflamatórias ou atuar na imunossupressão. Dessa forma, as BiNPs também poderiam apresentar toxicidade relacionada ao sistema imunológico. Macrófagos constituem um bom modelo para o estudo da imunotoxicidade de compostos e partículas como BiNPs, visto que são células fagocíticas que atuam na primeira linha de defesa contra agentes infecciosos. Sendo assim, a linhagem estabelecida de macrófagos murinos, *Raw 264.7* foi utilizada neste estudo como modelo experimental para avaliar a citotoxicidade de BiNPs.

4 HIPÓTESE

As BiNPs alteram o funcionamento celular dos macrófagos da linhagem *Raw 264.7*, causando aumento nos parâmetros relacionados à citotoxicidade, como danos no DNA, níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs), interferindo na atividade fagocítica e ciclo celular.

5 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a citotoxicidade das BiNPs em macrófagos da linhagem *Raw 264.7*.

5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar parâmetros relacionados à citotoxicidade inespecífica de BiNPs em macrófagos murinos por meio de ensaios de viabilidade e ciclo celular.
- Avaliar parâmetros relacionados à citotoxicidade específica de BiNPs em macrófagos murinos por meio do ensaio de fagocitose e dos ensaios para verificar os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs).
- Avaliar processo molecular possivelmente envolvido na citotoxicidade de BiNPs em macrófagos murinos por meio da análise de danos no DNA.

6 MATERIAL E MÉTODOS

6.1 CULTIVO DAS CÉLULAS DA LINHAGEM *Raw 264.7*

Alíquotas de células da linhagem *Raw 264.7* (Banco de células do Rio de Janeiro – BCRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) foram cultivadas em garrafas de cultura de 25 cm², com meio DMEM (*Dulbecco's Minimum Essential Medium*) alta glicose (Cultilab, ref. D1599), pH 7,4, com 3700 mg.L⁻¹ de bicarbonato de sódio (MGM, ref. 1010216), esterilizado por filtração em membrana com poros de 0,22 µm e suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco Invitrogen, ref. 12657), 10 µg.mL⁻¹ de estreptomicina e 10 U.mL⁻¹ de penicilina (Gibco Invitrogen, ref. 15140).

Para o crescimento e adesão, as células foram mantidas em incubadora a 37 °C e pCO₂ de 5%, com subcultivos realizados a cada 48 h. Para os experimentos, as células foram desaderidas com o uso de tripsina-EDTA (Sigma-Aldrich, ref. T4174), concentração final de 0,5 mg.mL⁻¹ de tripsina e 0,2 mg.mL⁻¹ de EDTA, por um período de 2 a 5 min a 37 °C, contadas, plaqueadas e cultivadas durante 24 h, seguida de exposição às BiNPs por 24 e 48 h. Foram plaqueadas 2x10⁴ e 10⁴ células por poço em placas de 96 poços, área de 0,33 cm², para os tempos de exposição de 24 e 48 h respectivamente para os experimentos de MTT, cristal violeta, azul de tripan, ERNs e EROs. Para o ensaio de ciclo celular foram plaqueadas 2,5x10⁵ e 1,5x10⁵ células por poço em placas de 6 poços, área de 9,60 cm², para os tempos de exposição de 24 e 48 h, respectivamente. Para os ensaios de atividade fagocítica e danos no DNA foram plaqueadas 5x10⁴ e 2,5x10⁴ células por poço em placas de 24 poços, área de 1,93 cm², com lamínulas de vidro previamente esterilizadas para os tempos de exposição de 24 e 48 h, respectivamente.

Todos os reagentes usados nos procedimentos foram pré-aquecidos em banho-maria a 37 °C.

6.2 SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS

As BiNPs foram obtidas por meio da colaboração com os pesquisadores Arandi G. Bezzerra Jr e Thiago Neves Machado (Laboratório Fotonanobio - Universidade Tecnológica Federal do Paraná). Estas BiNPs foram sintetizadas pelo método de ablação a laser em meio líquido (*LASiS*), que permite a produção de nanoestruturas de forma rápida, evitando a produção de resíduos e utilização de reagentes químicos, apresentando dessa forma impacto ambiental reduzido

(BARCIKOWSKI e COMPAGNINI, 2013). Esta técnica consiste na focalização de um feixe de laser pulsado de alta potência na superfície de um alvo sólido com alto grau de pureza imerso em solvente (TEIXEIRA ROSA, 2014).

Para a síntese das BiNPs, um alvo de Bi com alto grau de pureza (Sigma-Aldrich, CAS 7440-69-9) imerso em 5 mL de água bidestilada estéril foi irradiado com o comprimento de onda fundamental de um laser Nd:YAG (Quantronix, Hauppauge, NY, EUA; modelo 4117) operando a 1064 nm, *Q-switched* a 1,5 KHz, fornecendo pulsos de 200 ns. Uma lente focal de 5 cm foi usada para concentrar o laser no alvo de Bi por 2 min (figura 4).

As BiNPs tentem a agregar e precipitar aproximadamente 3 h após a síntese quando são mantidas em água pura, sendo que a adição de BSA torna a suspensão coloidal mais estável por meio da formação de uma corona. Portanto, para a estabilização, foi adicionada BSA (Sigma-Aldrich, ref. A7906) à suspensão em uma concentração final de 0,03% logo após a síntese.

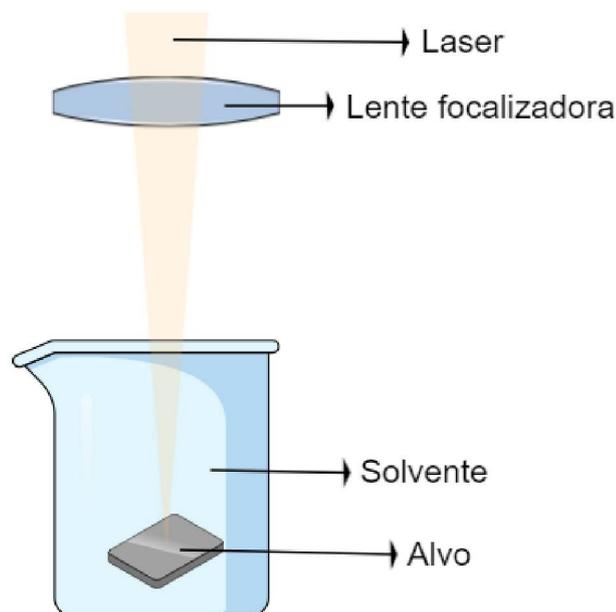


Figura 4. Esquema da montagem utilizada para realização da ablação a laser. Criado em mindthegraph.com a partir do esquema de Teixeira Rosa (2014).

6.2.1 UV-Vis

A espectroscopia ultravioleta-visível (UV-Vis) é o método mais usado para estudar a cinética de formação de NPs em suspensão, bem como o tamanho das partículas. Este método fornece dados sobre a interação da luz com a amostra dentro da faixa do espectro que vai de 200 a 1025 nm, permitindo uma análise rápida quanto à quantidade, tamanho e polidispersidade das NPs (SIGNORI, 2010).

Inicialmente foi medido o espectro (espectrômetro *Ocean Optics*, Dunedin, FL, EUA; modelo USB2000+ de 200 a 1000 nm; *software* operacional Spectrasuite 6.1) da luz transmitida pelo solvente no qual as BiNPs foram produzidas (água bidestilada) para que este sinal fosse utilizado como referência. Então foi medido o espectro da luz transmitida por meio da suspensão coloidal de BiNPs.

6.2.2 Espalhamento dinâmico de luz (DLS)

A medida do Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS, *Dynamic Light Scattering*) informa o tamanho das partículas suspensas em meio líquido. Nesta técnica, um laser incide sobre a amostra e a intensidade do feixe espalhado por um ângulo θ é medida ao longo do tempo (CARPENTER, 1977).

Foi medido o valor do DLS da suspensão coloidal de BiNPs por meio do equipamento Microtrac (Microtrac, Largo, FL, USA; modelo *Nanotrak Ultra*, *software* operacional FLEX *application* 10.6.0).

6.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Para os ensaios de MTT, cristal violeta e azul de tripan as concentrações utilizadas, baseadas em outros estudos com NPs de compostos de Bi (KOVRIŽNYCH *et al.*, 2013; ABUDAYYAK *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2017; REUS *et al.*, 2018) foram 0,01; 0,02; 0,05; 0,1; 0,5; 1; 2; 5; 10; 20 e 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, além de um grupo controle do experimento (meio de cultura com o volume de H₂O+BSA correspondente ao volume da suspensão de NPs dos grupos expostos. Para os ensaios de ERNs, EROs, ciclo celular, atividade fagocítica e danos no DNA as concentrações foram 0,05; 0,5; 5 e 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, além de um grupo controle do experimento.

6.4 INVESTIGAÇÃO DE CITOTOXICIDADE INESPECÍFICA

São aqui considerados ensaios que investigam citotoxicidade inespecífica aqueles comumente usados na área de toxicologia celular para avaliar parâmetros de toxicidade não relacionados à função específica de determinado tipo celular.

6.4.1 Ensaio do MTT

Este método, para avaliar citotoxicidade, baseia-se na capacidade de células viáveis reduzirem por meio das desidrogenases o MTT (3 - [4,5-dimetil-2-il] -2,

brometo de 5-difenil tetrazólio), formando cristais de formazan que possuem cor roxa característica ao serem dissolvidos em DMSO, possibilitando quantificação por espectrofotometria (MOSMANN, 1983; REILLY *et al.*, 1998).

Após o tempo de exposição de 24 e 48 h, o meio de cultura em que as células *Raw 264.7* estavam expostas foi removido e foram adicionados 200 μL de solução de MTT (Amresco, ref. 0793) em meio (concentração final $0,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) por poço. Após 2 h de incubação a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ e pCO_2 de 5% o meio contendo MTT foi removido e os poços foram lavados 2 vezes com PBS. Os cristais formados intracelularmente foram dissolvidos em 100 μL de DMSO (Synth, ref. D1011.01.BJ) por poço e a absorbância foi determinada em espectrofotômetro de microplacas (BioTek, Winooski, VT, EUA; modelo Epoch, *software* operacional Gen5) usando o comprimento de onda de 550 nm. Foram realizados 3 experimentos independentes.

Além disso, para verificar se a possível produção de EROs pelas células expostas poderia interferir no ensaio, podendo estar relacionada com a redução do MTT em cristais de formazan, foi feito um teste com a incubação de MTT a $0,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em PBS na presença de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por 2 h, seguido da quantificação da absorbância a 550 nm.

6.4.2 Ensaio do cristal violeta

O cristal violeta (cloreto de pararosanilina) é um corante básico também conhecido como violeta de Genciana, que cora o núcleo das células, de forma que a taxa de crescimento celular/quantidade de células aderidas é refletida pela determinação colorimétrica das células coradas (GILLIES *et al.*, 1986; VEGA-AVILA e PUGSLEY, 2011).

Após o tempo de exposição de 24 e 48 h, o meio de cultura em que as células *Raw 264.7* estavam expostas foi removido e os poços foram lavados uma vez com PBS para posterior fixação das com 100 μL de álcool metílico (Neon, ref. 00495) por poço por 15 min. O fixador foi substituído por 100 μL de solução de $0,25 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de cristal violeta (Certistain, ref. 42555) em água destilada por poço e as células foram incubadas por 10 min a temperatura ambiente. A solução de cristal violeta foi removida e os poços lavados duas vezes com 150 μL de água destilada. Foram adicionados 100 μL de ácido acético 33% (Neon, ref. 00114) por poço e o corante foi extraído mediante incubação sob agitação por 30 min a temperatura ambiente. Por

fim a absorbância foi determinada em espectrofotômetro de microplacas (BioTek, Winooski, VT, EUA; modelo Epoch, *software* operacional Gen5) usando o comprimento de onda de 570 nm. Foram realizados 3 experimentos independentes.

6.4.3 Ensaio do azul de tripan

Para a análise da viabilidade/citotoxicidade/integridade da membrana plasmática foi utilizado o corante azul de tripan, o qual não atravessa membranas íntegras. Assim, células vivas não permitem a passagem do corante e, logo, não adquirem nenhuma coloração, ao contrário das células mortas ou em processo de morte, que possuem suas membranas danificadas (STROBER, 2001).

Após o tempo de exposição de 24 e 48 h, o meio de cultura em que as células *Raw 264.7* estavam expostas foi removido e foram adicionados 50 µL do corante azul de tripan (Sigma-Aldrich, ref. T8154) em cada poço. Após 1 min, um poço por vez foi lavado com PBS e em seguida foram capturadas 3-4 imagens por poço sob um microscópio de luz invertido (Leica Microsystems, Wetzlar, HE, Alemanha; modelo DMIL LED, *software* operacional Leica Application Suite 3.0.0). Foram capturadas 30 imagens por grupo experimental (10 imagens por experimento em três experimentos independentes) e um mínimo de 100 células por imagem foram classificadas como viáveis ou não viáveis.

6.4.4 Ciclo celular

O ciclo celular representa a integralidade do período de divisão, envolvendo processos moleculares que são responsáveis pela proliferação celular. Ao estimar a quantidade de DNA da célula, estima-se a fase do ciclo celular, visto que a quantidade de DNA muda durante as fases. A quantificação pode ser feita por citometria de fluxo com o uso de um intercalante fluorescente de DNA, como o iodeto de propídio (CECCHINI *et al.*, 2012).

Após o tempo de exposição de 24 e 48 h, o meio de cultura em que as células *Raw 264.7* estavam expostas foi removido, as células foram tripsinizadas e fixadas em etanol 70% (Neon, ref. 0367). Os tubos contendo as células fixadas em etanol 70% foram centrifugados, o sobrenadante descartado e as células ressuspensas em 1 mL de PBS. Após nova centrifugação, o sobrenadante foi descartado e 1 mL de *staining buffer* (PBS com SFB 2%) foi adicionado a cada tubo. Para a marcação, o material foi novamente centrifugado, o sobrenadante descartado e as células

ressuspendidas em 500 µL de Iodeto de propídio (PI) e RNase (BD Pharmigen, ref. 550825) em *staining buffer*. Por fim, a fluorescência das amostras foi analisada por citometria de fluxo (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EUA; modelo Accuri C6 Plus, *software* operacional BD Accuri C6). Foram realizados 3 experimentos independentes.

6.5 INVESTIGAÇÃO DA CITOTOXICIDADE ESPECÍFICA

Aqui são considerados ensaios para investigar citotoxicidade específica aqueles relacionados a alterações em funções específicas de células fagocíticas, como o ensaio de atividade fagocítica. Também fazem parte dessa categoria os ensaios para investigar os níveis de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, isso porque além dos efeitos adversos que ERNs e EROs possuem, também atuam no controle da sinalização do sistema imunológico inato e adaptativo (WINK *et al.*, 2011).

6.5.1 Atividade fagocítica

O ensaio para avaliar a atividade fagocítica foi baseado em Glinski *et al.* (2016).

Após o tempo de exposição de 24 e 48 h, o meio de cultura em que as células *Raw 264.7* estavam expostas foi removido e foi adicionado 1 mL de suspensão de leveduras (2×10^6 leveduras *Saccharomyces cerevisiae* por mL de DMEM) a cada poço de uma placa de 24 poços com lamínulas de vidro, na proporção de aproximadamente 10 leveduras por macrófago. Após 2 h de incubação, as células foram lavadas uma vez com PBS, fixadas em etanol 95% por 5 min a temperatura ambiente, lavadas uma vez com etanol 70% e depois com água destilada. Então foram coradas com Giemsa (Merck, ref. 109204) filtrado 20% por 5 min e lavadas com água corrente. Em seguida foi feita a desidratação com passagem rápida das lamínulas de vidro em etanol 70%, 90%, 100% (2x), etanol-xilol 1:1, etanol-xilol 1:2 e xilol (Anidrol, ref. PAP.A-2415). Por fim as lâminas foram montadas em resina *Permount* e as imagens capturadas em *scanner* de lâminas (Zeiss, Oberkochen, BW, Alemanha; modelo Metafer V 3.9, *software* operacional VSViewer). Para a análise foram contados o número total de macrófagos (A), número de macrófagos com leveduras internalizadas (B) e o número de leveduras internalizadas (C), sendo que o índice de fagocitose foi calculado de acordo com (BUCHI e SOUZA, 1992) por

meio da fórmula $(C/B) \times (B/A)$. Foram contadas aproximadamente 300 células por grupo experimental, sendo 100 por experimento independente, num total de três experimentos independentes.

6.5.2 Produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)

As EROs são moléculas que, em excesso, danificam DNA e RNA, além de oxidar proteínas e lipídios (peroxidação lipídica). As EROs não são produzidas somente em situações patológicas, mas também durante processos fisiológicos normais, como sinalização celular. EROs podem ser prejudiciais quando produzidas em quantidades elevadas nos compartimentos intracelulares (estresse oxidativo) sem contrabalanceamento adequado das células, como o aumento dos níveis de enzimas antioxidantes como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e moléculas como glutatona (GSH) que convertem radicais livres para moléculas não tóxicas ou menos tóxicas (WU e YOTNDA, 2011). As ERNs e EROs são produzidas por macrófagos e outras células do sistema imunológico, onde participam da indução, manutenção e/ou término de respostas inflamatórias (WINK *et al.*, 2011).

Após o tempo de exposição de 24 e 48 h, o meio de cultura em que as células *Raw 264.7* estavam expostas foi substituído por meio de cultura contendo 10 μM de 2,7-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCF, Thermo Fisher, ref. D399). Em seguida os macrófagos foram incubados durante 15 min a 37° C e protegido da luz. 2,7-diclorodihidrofluoresceína diacetato, quando oxidada pela célula gera um produto fluorescente. Sendo assim, depois que os poços foram lavados duas vezes com PBS foi então medida a fluorescência em espectrofluorímetro (Tecan, Männedorf, ZH, Suíça; modelo *Infinite M200*, software operacional *i-Control 1.6*) usando o comprimento de onda 488 nm (excitação) e 530 nm (emissão). Foram realizados 3 experimentos independentes.

6.5.3 Produção de espécies reativas de nitrogênio (ERNs)

Os níveis de óxido nítrico foram determinados como descrito por Misko *et al.* (1993) e Glinski *et al.* (2016). Após o tempo de exposição de 24 e 48 h, foram transferidos 150 μL de cada poço do meio de cultura em que as células *Raw 264.7* estavam expostas para uma microplaca preta, seguidos da adição de 10 μL de 2,3-diaminonaftaleno (DAN, Invitrogen, ref. D7918) a 0,5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, que reage com óxido nítrico em ambiente ácido gerando um composto fluorescente, com HCl (0,62 M). As

microplacas foram agitadas suavemente e incubadas a 25° C, protegidas da luz. Após 30 min, foram adicionados 5 µL de NaOH a 2,8 M aos poços, deixando em pH ideal para a leitura da fluorescência. A formação de 1-naftotriazol, derivado da reação de nitrito e DAN foi determinada por meio da leitura da fluorescência (Tecan, Männedorf, ZH, Suíça; modelo *Infinite M200*, software operacional *i-Control 1.6*), usando o comprimento de onda de 365 nm (excitação) e 450 nm (emissão). Foram realizados 3 experimentos independentes.

6.6 INVESTIGAÇÃO DE CITOTOXICIDADE RELACIONADA A MECANISMOS CELULARES

São aqui considerados ensaios para investigar citotoxicidade relacionada a mecanismos celulares aqueles que buscam avaliar alterações em processos moleculares e que podem estar relacionados à citotoxicidade.

6.6.1 Danos no DNA

Por estímulo da quebra da dupla fita de DNA, a ATM quinase (*ataxia telangiectasia mutated*) fosforila o terminal hidroxila da H2AX no resíduo serina-139, essa proteína recém-fosforilada, gamma-H2AX, recruta para o local de dano proteínas e ciclinas relacionadas ao reparo do DNA por dois sistemas principais: união de extremidades não homólogas e recombinação homóloga (ZHA *et al.*, 2008; CHAPMAN *et al.*, 2012). Um anticorpo contra gamma-H2AX pode ser usado para avaliar esses danos no DNA, pois pode ser visualizado por imunofluorescência direta ou indireta (KUO e YANG, 2008).

Após o tempo de exposição de 24 e 48 h, o meio de cultura em que as células *Raw 264.7* estavam expostas foi retirado, em seguida as células foram fixadas em paraformaldeído 4% (Sigma-Aldrich, ref. 158127) em PBS por 30 min, permeabilizadas com Triton-X 0,2% em PBS por 10 min, lavadas uma vez com PBS e incubadas com anti-fosfo-H2AX de camundongo conjugada a Alexa Fluor 488 (eBioscience, ref. 53-9865-82) em uma diluição de 1:100 em PBS por 2 h e DAPI (Sigma-Aldrich, ref. D9542) a 5 µg.mL⁻¹ por 10 min. As lâminas foram montadas em resina *Fluormount* e então capturadas 4 imagens por grupo em cada experimento em microscópio confocal (Nikon, Shinagawa, TJ, Japan; modelo: microscópio Nikon Eclipse Ti e sistema Nikoon A1r MP, software operacional NIS-Elements Viewer 4.20), contadas aproximadamente 200 células por grupo experimental, 100 por

experimento independente e classificadas como marcadas ou não. Foram realizados 2 experimentos independentes até o momento.

6.7 TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS

Os dados, que representam as médias das pseudoréplicas de cada grupo experimental, num total de 3 valores por grupo experimental (equivalente aos 3 experimentos independentes) foram analisados por meio do teste não paramétrico de *Kruskall-Wallis* seguidos pelo pós-teste de *Dunns*, quando aplicável para comparação dos grupos expostos *versus* controle. Diferenças foram consideradas significativas quando apresentavam valor de p menor que 0,05.

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 CARACTERIZAÇÃO DAS BiNPs

A síntese das BiNPs seguiram um intervalo de ~30 dias, tempo em que as NPs mantinham as mesmas características, ou seja, sem apresentar precipitação e/ou aglomeração. A concentração e média de tamanho das BiNPs variou pouco de uma síntese para outra. A concentração máxima e mínima encontrada foi de 1,8 e 1,0 mg.mL⁻¹ respectivamente e a média de tamanho máxima e mínima encontrada foi de 52 e 22 nm respectivamente, sendo que a faixa se concentrava entre 1 a 90 nm, o que indica uma ampla faixa de distribuição de tamanho das NPs quando sintetizadas por meio do método físico *LASiS*.

7.1.1 UV-Vis

Os resultados do espectro de absorção UV-Vis das suspensões coloidais de BiNPs em água bidestilada acrescida de BSA, sintetizadas durante o período em que se deu a pesquisa, indicaram concentrações que variaram de 1 a 1,8 mg.mL⁻¹. No gráfico 1, que mostra a síntese realizada em maio de 2018, a medida da concentração da suspensão coloidal foi de 1,5 mg.mL⁻¹.

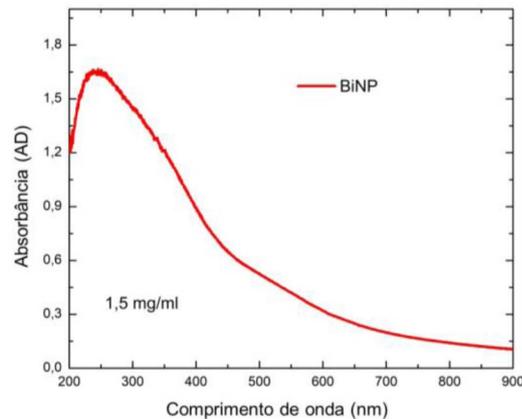


Gráfico 1. Espectro de absorção UV-Vis da suspensão coloidal de BiNPs em água bidestilada acrescida de BSA. Eixo “y” representa a absorbância que é proporcional ao número de partículas, e eixo “x” o comprimento de onda.

7.1.2 DLS

As medidas de DLS indicaram que as amostras de BiNPs apresentaram uma ampla distribuição de tamanho, com maior prevalência entre 25 nm e 60 nm, chegando até 170 nm na síntese realizada em outubro de 2018.

Conforme se observa no gráfico 2, que mostra a medida DLS da síntese realizada em agosto de 2018, as BiNPs apresentaram uma faixa de distribuição de 4 a 87 nm, com maior prevalência entre 25 a 60 nm.

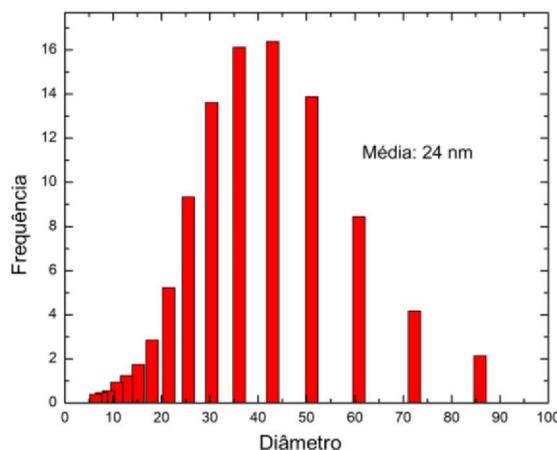


Gráfico 2. Histograma DLS da suspensão coloidal de BiNP em água bidestilada acrescida de BSA, indicando que apresentaram ampla faixa de distribuição de tamanho. Síntese: Agosto de 2018.

Outra caracterização possível é em relação ao potencial zeta, uma medida do poder da repulsão - atração eletrostática ou cargas entre partículas, sendo um dos parâmetros fundamentais que afetam a estabilidade de uma suspensão (LIN *et al.*, 2014). Reus *et al.* (2018) verificaram as medidas do potencial zeta da suspensão coloidal de BiNPs, que em água estava dentro da faixa do que é considerado estável (superior a +30 mV ou inferior a -30 mV), com média de +39,1 mV, mas que com a

adição de BSA, passa para -23 mV. Essa redução do valor do potencial zeta é esperada na presença de corona orgânica, mas como esse valor deixa de estar na faixa do que seria considerado estável, pode não ter relação direta com estabilidade da suspensão no caso das BiNPs.

Ao contrário das células não fagocíticas, as fagocíticas interagem preferencialmente com partículas carregadas negativamente (FRÖHLICH, 2012), sendo assim, o processo de estabilização das BiNPs com BSA, ao se relacionar com o aumento da interação célula-NP, tem influência na citotoxicidade dessas NPs.

Outra técnica de caracterização de NPs bastante usada é a microscopia eletrônica de transmissão (MET). O microscópio eletrônico de transmissão é um importante equipamento na caracterização de nanoestruturas por ter uma resolução subnanométrica, sendo muito utilizado na análise da morfologia, do arranjo atômico e de defeitos de materiais e no caso de NPs, pode ser usado na determinação do tamanho médio e da forma das mesmas (HARDY *et al.*, 2018). Em relação à caracterização das BiNPs feita por meio de MET, foi observado que as BiNPs sintetizadas pelo método físico LASiS, além de apresentarem ampla faixa de distribuição de tamanho, apresentaram formato esférico (dados não publicados disponibilizados pelo laboratório Fotonanobio).

Vários trabalhos relatam uma relação entre toxicidade e tamanho das NPs, sendo essas variáveis inversamente proporcionais (BAHADAR *et al.*, 2016). Como as BiNPs usadas no presente estudo apresentaram ampla faixa de distribuição de tamanho, típico para NPs produzidas com a técnica LASiS para muitas nanopartículas, em que suspensões monodispersas são possíveis, mas difíceis de alcançar (BEZERRA *et al.*, 2017), não é possível descartar que as respostas observadas nos macrófagos expostos às BiNPs podem ter sido em decorrência de diferentes mecanismos de toxicidade, que variam dependendo do tamanho da NP (SHANG *et al.*, 2014).

7.2 CITOTOXICIDADE INESPECÍFICA

7.2.1 Ensaio do MTT

Os resultados do ensaio do MTT não permitiram identificar citotoxicidade nas células expostas às BiNPs por 24 h até a concentração de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Contudo, observou-se como consequência da exposição por 48 h, redução na capacidade das

células de converterem MTT em formazan nas concentrações 10 (24%), 20 (45%) e 50 (64%) $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (gráfico 4).

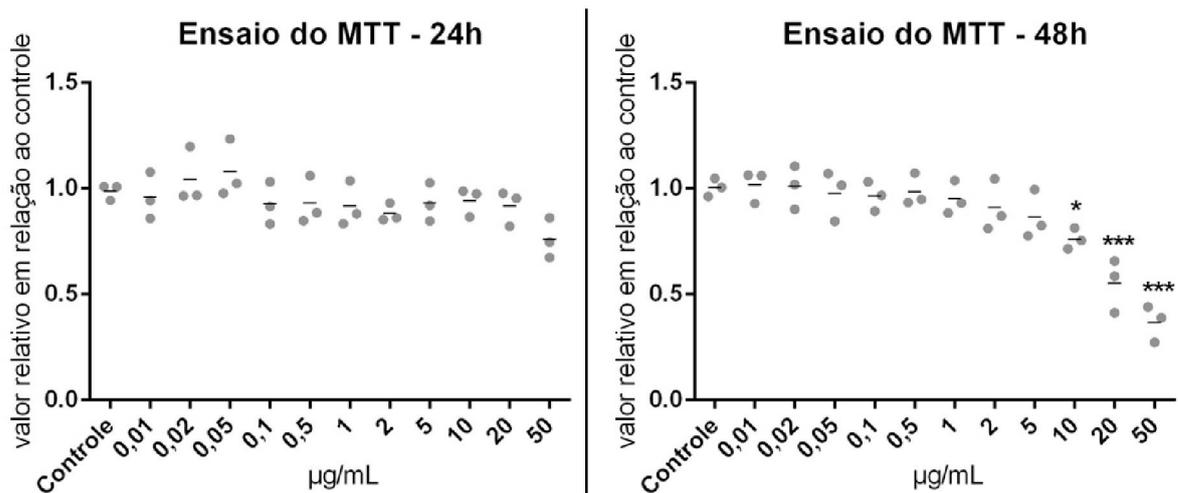


Gráfico 3. Conversão do MTT em formazan em células *Raw 264.7* após 24 e 48 h a diferentes concentrações de BiNPs ($0\text{-}50\mu\text{g.mL}^{-1}$). Réplicas (pontos) e média (linha horizontal). Asterisco (*) indica diferença significativa em relação ao grupo controle. * $p<0,05$; *** $p<0,001$. Três experimentos independentes.

Em relação ao teste para observar a possível interferência da produção de EROs na redução do MTT em cristais de formazan pelas células, foi observado que H_2O_2 não foi capaz de reduzir o MTT em nenhuma das concentrações testadas, mesmo em concentrações altas como 5mM (gráfico 5).

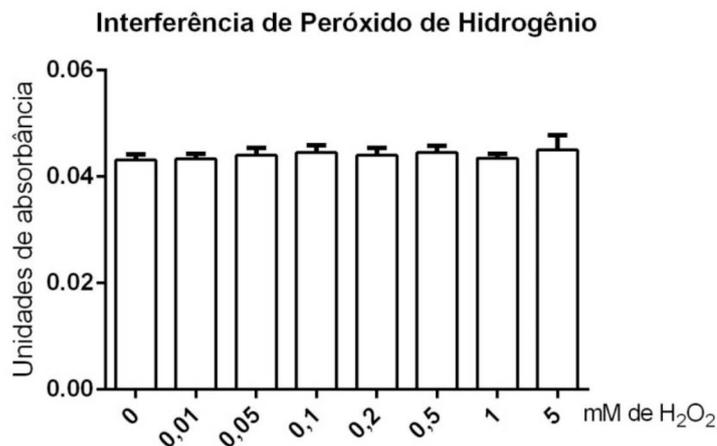


Gráfico 4. Interferência de peróxido de hidrogênio no ensaio do MTT. Média \pm intervalo de confiança (95%). Não houve alteração.

Abudayyak *et al.* (2017) verificaram que NPs similares, de Bi_2O_3 diminuem, de maneira concentração-dependente, a conversão do MTT nas linhagens *HepG2*, *NRK-52E*, *Caco-2* e *A549* expostas a concentrações de 1 a $100\mu\text{g.mL}^{-1}$ por 24 h.

Liu *et al.* (2017) verificaram que BiNPs diminuíram o a conversão do MTT das células da linhagem *A549* em $\sim 78\%$ na maior concentração testada ($160\mu\text{g.mL}^{-1}$)

quando expostas por 48 h, o que demonstra leve toxicidade de BiNPs em células pulmonares. Em comparação, BiNPs reduziram mais significativamente a conversão do MTT em células da linhagem *HEK293*: ~80% na concentração de 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, mas os autores destacam que essa toxicidade em célula renal pode também ser em decorrência dos íons de Bi ou efeito combinado dos íons presentes na suspensão e das BiNPs.

A redução na quantidade de células aderidas ou interferência na proliferação celular, observada por meio do ensaio do cristal violeta (item 7.2.2), influencia parcialmente nos resultados observados de redução da conversão do MTT, visto que quando se utiliza dados da relação da média de cada experimento do ensaio do MTT sobre média de cada experimento do ensaio cristal violeta o teste estatístico deixar de identificar redução significativa dos valores, considerando significância mínima de 5% ($p < 0,05$) (gráfico 6). Contudo, como o desvio padrão passa a ser maior, o efeito na conversão do MTT ainda poderia ser confirmado estatisticamente, por meio do aumento do N, visto que se nota a manutenção do padrão de redução em 20 e 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de BiNPs no gráfico.

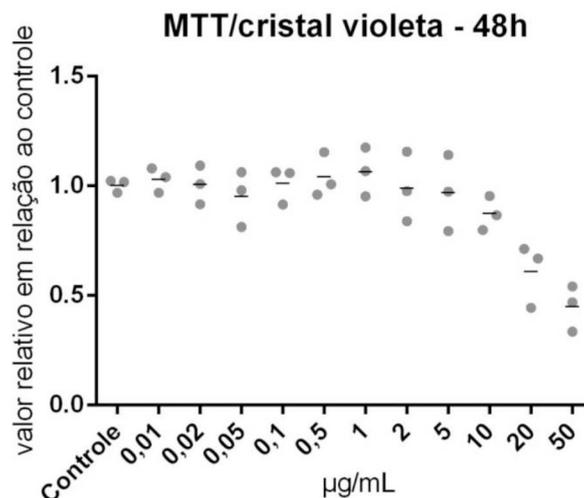


Gráfico 5. Relação: média de cada experimento do ensaio do MTT sobre a média de cada experimento do ensaio cristal violeta em células *Raw 264.7* após 48 h expostas a diferentes concentrações de BiNPs (0-50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Réplicas (pontos) e média (linha horizontal). Não foi observada diferença significativa.

7.2.2 Ensaio de cristal violeta

Por meio do ensaio de cristal violeta não foi identificado redução na quantidade de células aderidas ou interferência na proliferação celular em células expostas por 24 h às BiNPs. Contudo, havia menos células aderidas (redução de 8 a

18%) após exposição por 48 h nas concentrações de 1 a 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (gráfico 7 e figura 6).

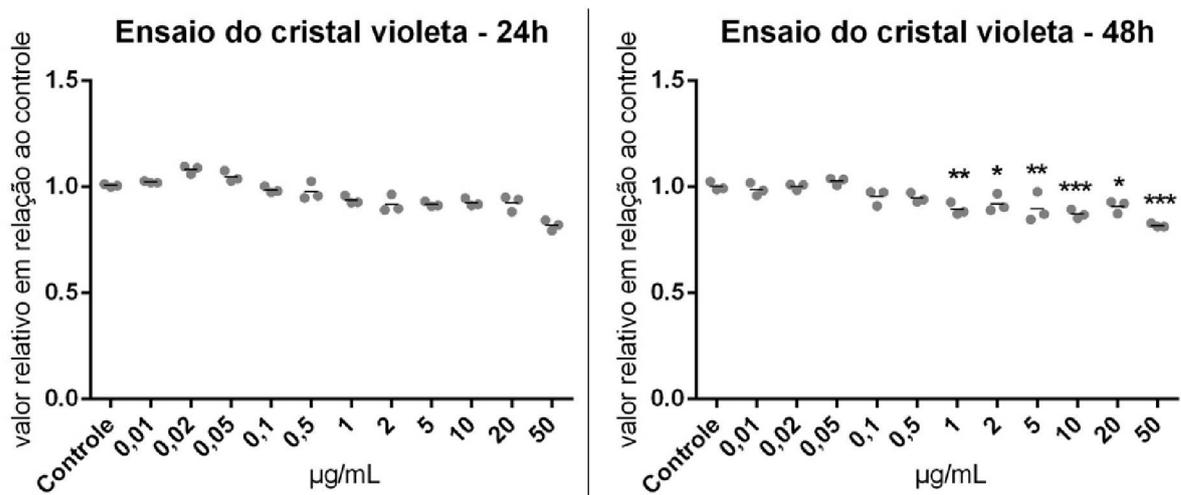


Gráfico 6. Quantidade de células aderidas após 24 e 48 h de exposição a diferentes concentrações de BiNPs. Réplicas (pontos) e média (linha horizontal). Asterisco (*) indica diferença significativa em relação ao grupo controle. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Três experimentos independentes.

Alguns estudos mostram que outras NPs metálicas, como NPs de ouro, prata e dióxido de titânio causam perda de adesão celular. Peng *et al.* (2019) observaram que essas NPs causam perda de adesão ao impedir interações de VE-caderina-VE-caderina em células de tecido endotelial microvascular humano. Wei *et al.* (2007) observaram que NPs de ouro causam perda de adesão celular em células *HepG2*. Dessa forma, a redução na quantidade de células *Raw 264.7* expostas à BiNPs por 48 h pode não estar relacionada à redução da proliferação celular, mas sim a perda da capacidade de adesão.

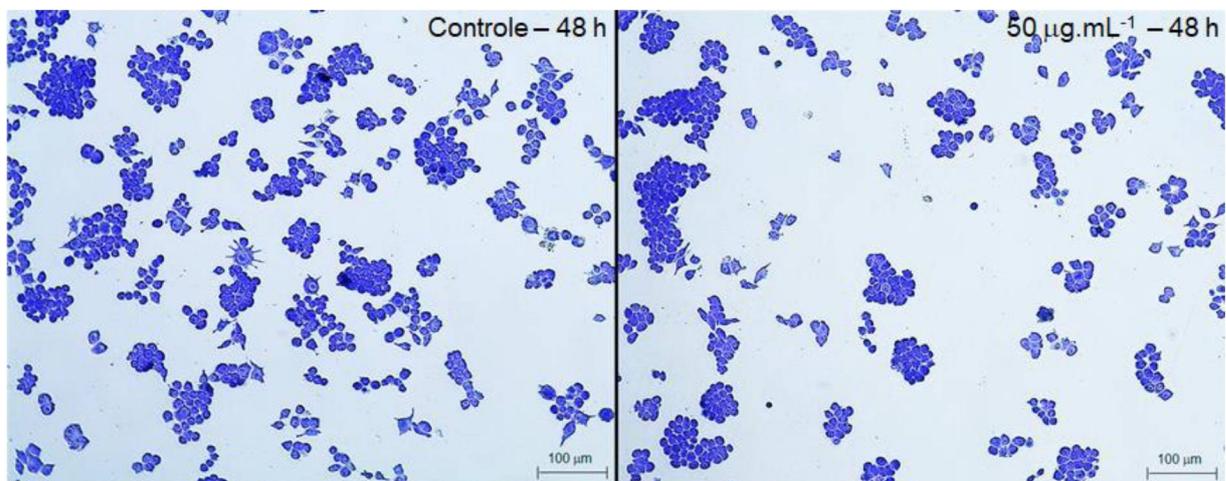


Figura 5. Fotomicrografias de células *Raw 264.7* coradas com cristal violeta, antes da extração do corante com ácido acético, do controle e de células expostas a 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de BiNPs por 48 h. Observar a redução da quantidade de células após exposição às BiNPs.

7.2.3 Ensaio de azul de tripan

Por meio do ensaio de azul de tripan foi observado que a viabilidade celular não foi alterada quando as células ficaram expostas por 24 h, havendo leve redução da viabilidade quando as células ficaram expostas por 48 h (~2%) na concentração de $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (gráfico 8 e figura 7).

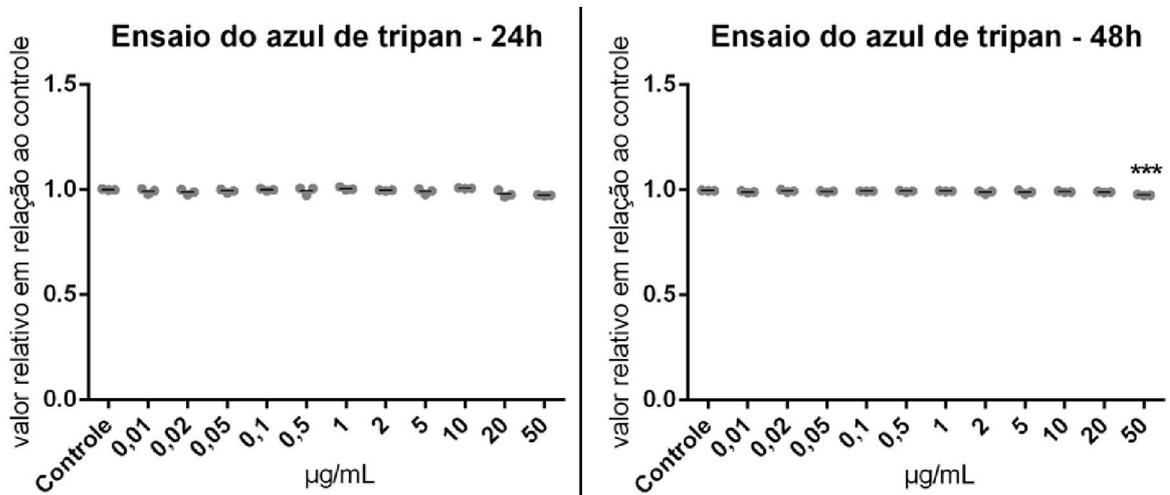


Gráfico 7. Viabilidade celular após 24 e 48 h de exposição às BiNPs. Réplicas (pontos) e média (linha horizontal). Asterisco (*) indica diferença significativa em relação ao grupo controle. *** $p < 0,001$. Três experimentos independentes.

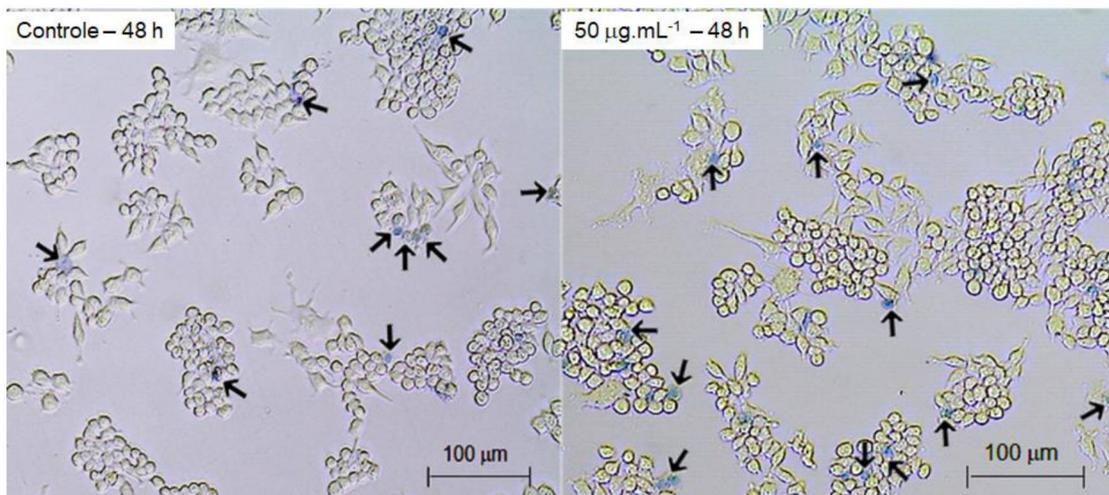


Figura 6. Fotomicrografias de células Raw 264.7 incubadas com azul de tripan após 48 h de exposição às BiNPs. Células não viáveis (setas).

Com isso, infere-se que apesar da exposição às BiNPs por 24 e 48 h alterar alguns parâmetros relacionados a toxicidade na célula *Raw 264.7*, essa alteração não é ou é pouco capaz de reduzir a viabilidade a ponto de causar rupturas na membrana plasmática, visto que a membrana continua íntegra durante esses tempos de exposição.

Sabella *et al.* (2014) descreve um mecanismo geral pelo qual as NPs metálicas geram citotoxicidade. Primeiramente acontece a entrada das NPs na célula por transporte ativo, p. ex. mediado por clatrina, caveolina e *lipid rafts*, então o confinamento em vesículas, endossomos e por fim em lisossomos, desencadeamento do efeito de cavalo de tróia pelo pH ácido do lisossomo, resultando em aumento da liberação de íons, que exercem citotoxicidade ao inativar ou diminuir a função de enzimas e desnaturar proteínas, gerando dano em organelas, resultando em aumento dos níveis de EROs e finalmente danos no DNA e na membrana plasmática. Dessa forma, o ensaio do MTT foi mais sensível para detectar citotoxicidade das BiNPs nas células *Raw 264.7* porque funções enzimáticas são alteradas antes de se observar danos na membrana. Possivelmente, se as células fossem expostas por um tempo maior, seria observado aumento na ruptura da membrana.

7.2.4 Ciclo celular

Por meio do ensaio de ciclo celular foi observado que a distribuição das células nas fases do ciclo celular não foi alterada pela exposição as BiNPs por 24 e 48 h (gráfico 9).

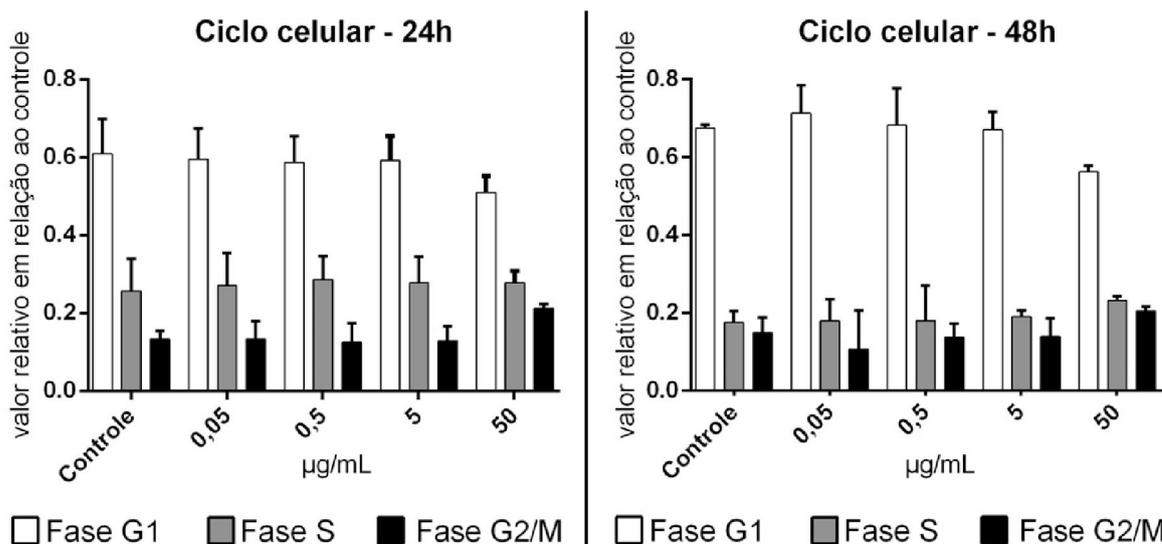


Gráfico 8. Distribuição das células nas fases do ciclo celular após 24 e 48 h de exposição às BiNPs. Média \pm intervalo de confiança (95%). Não houve diferença significativa.

A capacidade de manter a integridade genômica é vital para a sobrevivência e proliferação celular. O que garante essa integridade genômica são mecanismos de controle chamados *checkpoint*, que podem gerar um atraso transitório que proporciona à célula mais tempo para reparar os danos antes de progredir para a

próxima fase do ciclo celular, diminuindo assim a taxa de proliferação (SHACKELFORD *et al.*, 1999). Como foi observado uma redução do número de células aderidas por meio do ensaio do cristal violeta, o mais provável é que esse resultado esteja relacionado com a redução da adesão celular e não com redução da proliferação, visto que não foi observada alteração no perfil de distribuição das células *Raw 264.7* nas fases do ciclo celular quando expostas às BiNPs.

7.3 CITOTOXICIDADE ESPECÍFICA

7.3.1 Atividade fagocítica

Por meio do ensaio de atividade fagocítica foi observado aumento no índice fagocítico quando as células ficaram expostas por 24 (~210%) e 48 h (93%~) à concentração de 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (gráfico 10).

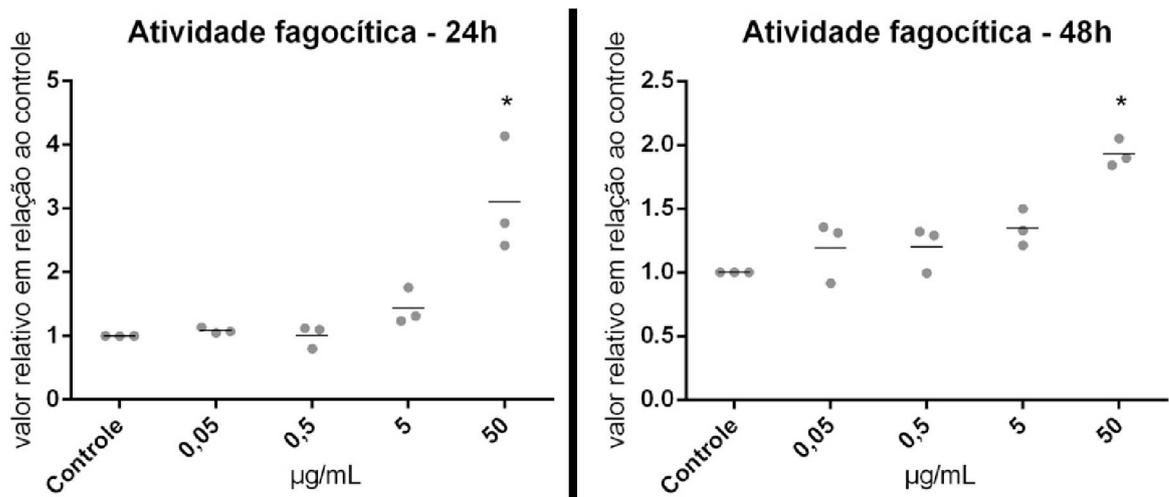


Gráfico 9. Índice fagocítico após 24 e 48 h de exposição às BiNPs. Réplicas (pontos) e média (linha horizontal). Asterisco (*) indica diferença significativa em relação ao grupo controle. * $p < 0,05$. Três experimentos independentes.

Na figura 8 é possível observar as células com as leveduras internalizadas coradas com Giemsa nos grupos controle e exposto por 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de BiNPs por 24 e 48 h.

Estudos mostraram que outras NPs metálicas também foram capazes de aumentar o índice fagocítico de macrófagos expostos. Wang *et al.* (2011) observaram por meio de investigações *in vivo* (exposição intranasal em camundongos) e *in vitro* (células *BV-2*⁷) que micróglia expostas as NPs de óxido de ferro tiveram o índice fagocítico aumentado. Chen *et al.* (2018) observaram que células *Raw 264.7* e macrófagos de cultivo primário derivados de medula óssea de

⁷ A linhagem BV-2 tem origem de micróglia de camundongo neonato induzidas com *raf/myc*.

camundongo NPs, expostos à dióxido de titânio, aumentaram significativamente a fagocitose de *E.coli*, além de observarem, por meio de análise proteômica, regulação positiva de proteínas do sistema complemento.

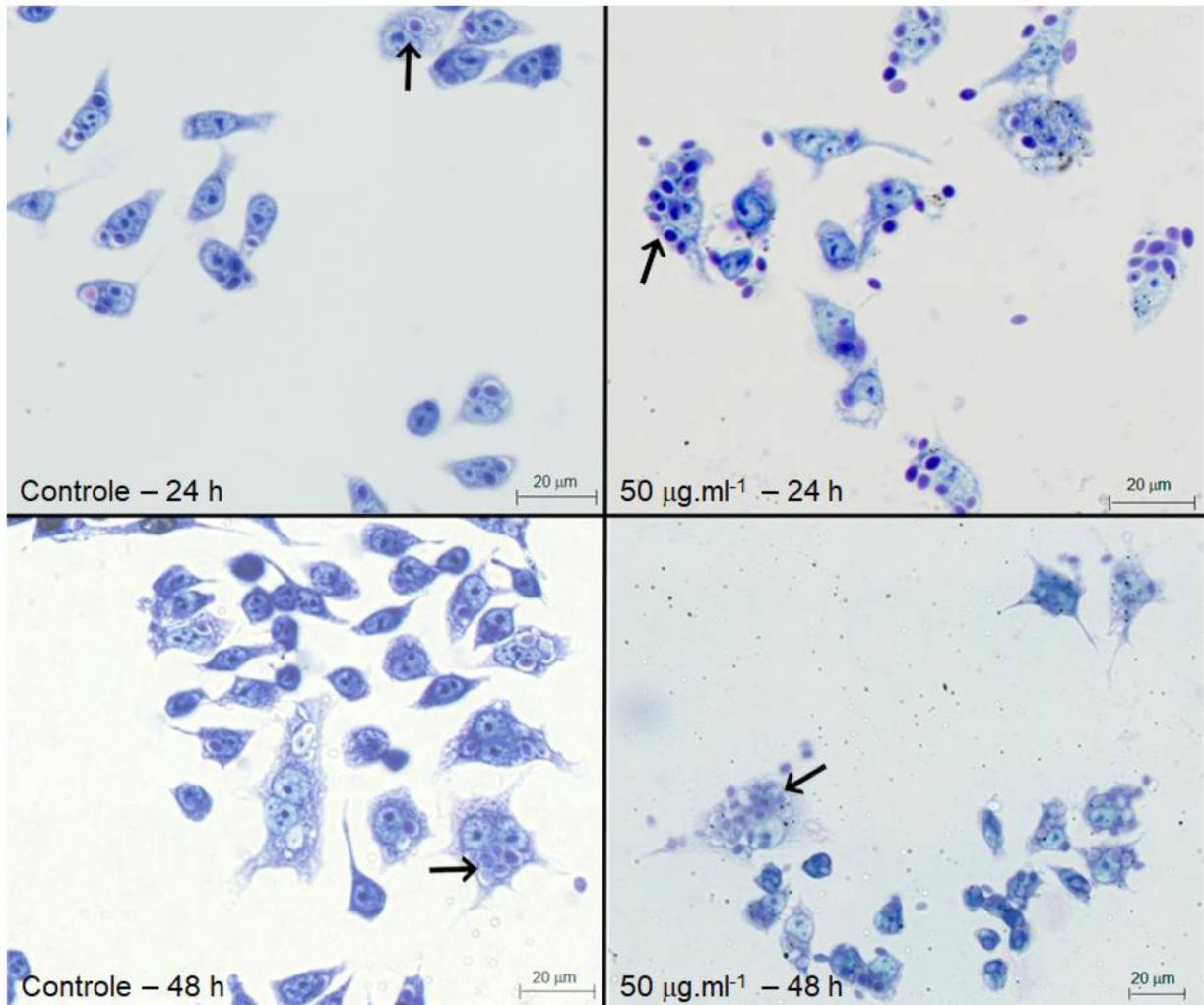


Figura 7. Fotomicrografias de células Raw 264.7 incubadas por 2 h com leveduras após o período de exposição às BINPs e coradas com Giemsa. Leveduras internalizadas (setas).

Assim, algumas NPs metálicas aumentam o índice fagocítico de macrófagos. Contudo, não são descritos os mecanismos exatos pelos quais essas NPs interferem na fagocitose e o tipo de interação que leva a esse processo.

Os macrófagos iniciam a fagocitose identificando padrões moleculares associados ao patógeno na superfície por meio de receptores de reconhecimento de padrões, que incluem lectinas, receptor de manose (MR), receptores *Toll-like* (TLRs) e receptor de Fcγ (FcγR). O TLR4, um membro da família TLR, desempenha um papel crítico na detecção de patógenos e desencadeamento de respostas imunológicas por meio do início da transdução de sinal (BI *et al.*, 2017). Como

observaram Da silva *et al.* (2018), as células *Raw 264.7* e *BHK-21*⁸ foram capazes de endocitar NPs de BSA por meio da interação com receptores da superfície celular. Como a suspensão de BiNPs usada nesse estudo foram estabilizadas com BSA, a possível interação de BSA, mesmo não se tratando de proteínas comuns detectadas na corona de NPs metálicas quando em plasma sanguíneo (VINLUAN e ZHENG, 2015), com receptores de superfície pode ser o que causa o aumento do índice fagocítico das células *Raw 264.7*.

O complexo proteico NF- κ B e a proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) são elementos-chave relacionados à sinalização pró-inflamatória, sendo o NF- κ B um fator de transcrição evolutivamente conservado que modula a expressão de vários genes envolvidos nas respostas imunológicas (BI *et al.*, 2017). Como ambas as vias de sinalização são consideradas envolvidas na fagocitose, as BiNPs também poderiam estar interferindo nessas vias nas células *Raw 264.7* expostas.

7.3.2 Níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs)

Não foi observada alteração nos níveis de EROs de células quando expostas por 24 h às BiNPs, mas houve aumento pontual de ~10% em células expostas a 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de BiNPs por 48 h (gráfico 11).

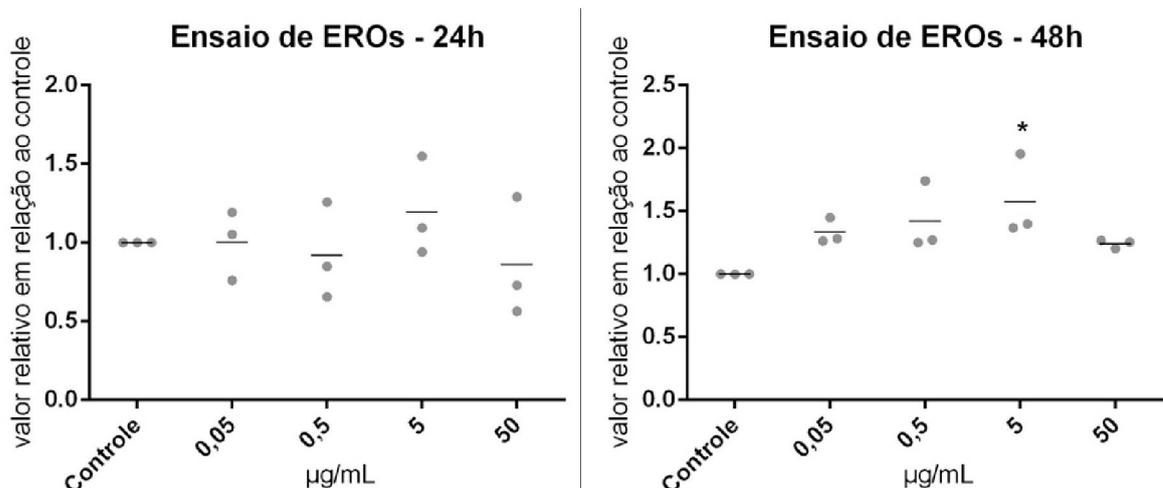


Gráfico 10. Níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) após 24 e 48 h de exposição às BiNPs. Réplicas (pontos) e média (linha horizontal). Asterisco (*) indica diferença significativa em relação ao grupo controle. * $p < 0,05$. Três experimentos independentes.

Além de estarem envolvidas com toxicidade, as EROs também participam de sinalização celular nos macrófagos (BYLUND *et al.*, 2010). Como foi observado apenas um leve aumento dos níveis de EROs nas células expostas somente a 5

⁸ A linhagem de fibroblastos *BHK-21* tem origem de tecido renal de hamster.

$\mu\text{g.mL}^{-1}$, a exposição às BiNPs não é capaz de interferir com processos de sinalização celular dependentes de EROs das células *Raw 264.7*.

Células fagocíticas aumentam o consumo de oxigênio durante a fagocitose de patógenos e durante esse processo o oxigênio é reduzido pela NADPH oxidase, sendo esperado um aumento de EROs nessas células (BYLUND *et al.*, 2010). Como foi observado aumento de atividade fagocítica nas células *Raw 264.7* expostas às BiNPs por 24 (~210%) e 48 h (93%~) à concentração de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (gráfico 10), o esperado seria encontrar também um aumento nos níveis de EROs. Talvez em um tempo maior de exposição fosse possível observar esse aumento, ou uma quantificação de EROs extracelular, visto que as enzimas NADPH oxidase são abundantes na membrana plasmática de fagócitos.

Além disso, como foi observado que a exposição das células *Raw 264.7* às BiNPs altera alguns parâmetros relacionados à citotoxicidade, como a conversão do MTT em formazan, principalmente nas maiores concentrações e por 48 h, infere-se que os mecanismos de citotoxicidade das BiNPs que levaram a essas alterações não estão relacionados ao aumento dos níveis de EROs.

7.3.3 Níveis de espécies reativas de nitrogênio (ERNs)

Não foi observada alteração nos níveis extracelulares de ERNs em células expostas às BiNPs por 24 h, mas houve redução de ~10% nas expostas por 48 h a $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (gráfico 12).

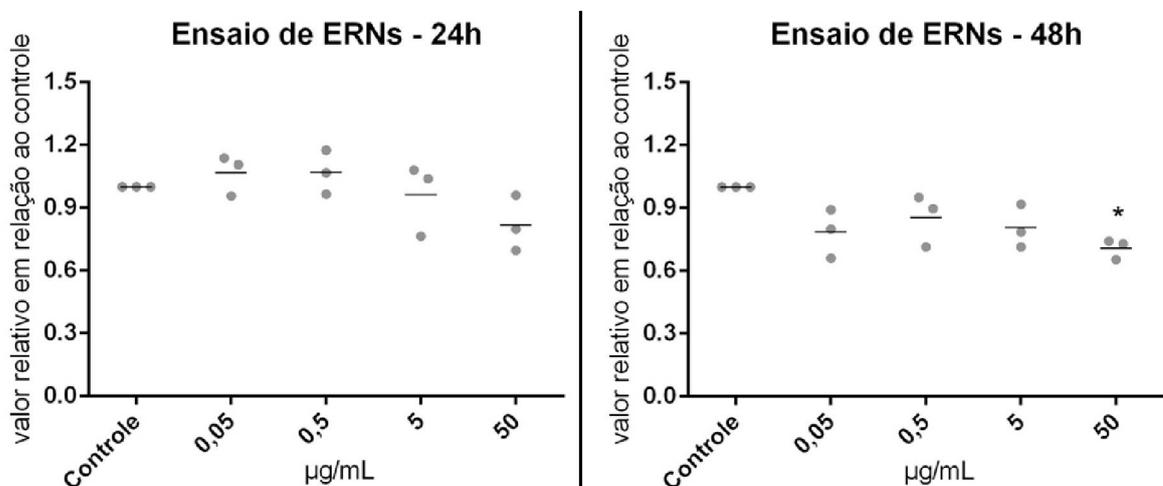


Gráfico 11. Níveis de espécies reativas de nitrogênio (ERNs) após 24 e 48 h de exposição às BiNPs. Réplicas (pontos) e média (linha horizontal). Asterisco (*) indica diferença significativa em relação ao grupo controle. * $p < 0,05$. Três experimentos independentes.

O óxido nítrico é uma molécula que difunde rapidamente pelas membranas celulares, é altamente reativa, reagindo com alvos moleculares como proteínas e aminas contendo grupamentos heme e tiol. ERNs também podem modificar pós-traducionalmente as proteínas, resultando em alteração da função. Por exemplo, a S-nitrosilação mediada por ERNs da proteína surfactante-D (SP-D) resulta em uma mudança em sua atividade biológica de anti-inflamatória para pró-inflamatória (LASKIN *et al.*, 2010). Como os níveis extracelulares de óxido nítrico não foram significativamente alterados nas células *Raw 264.7* quando expostas à BiNPs, os mecanismos de citotoxicidade não estão relacionados à essa molécula. Como o resultado sugere, apenas a exposição a $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ pode alterar a sinalização de macrófagos por meio de ERNs.

7.4 CITOTOXICIDADE RELACIONADA A MECANISMOS CELULARES

7.4.1 Danos no DNA

Não foi observada diferença significativa em danos no DNA nos grupos expostos às BiNPs nos tempos de 24 e 48 h comparados com o grupo controle (gráfico 13).

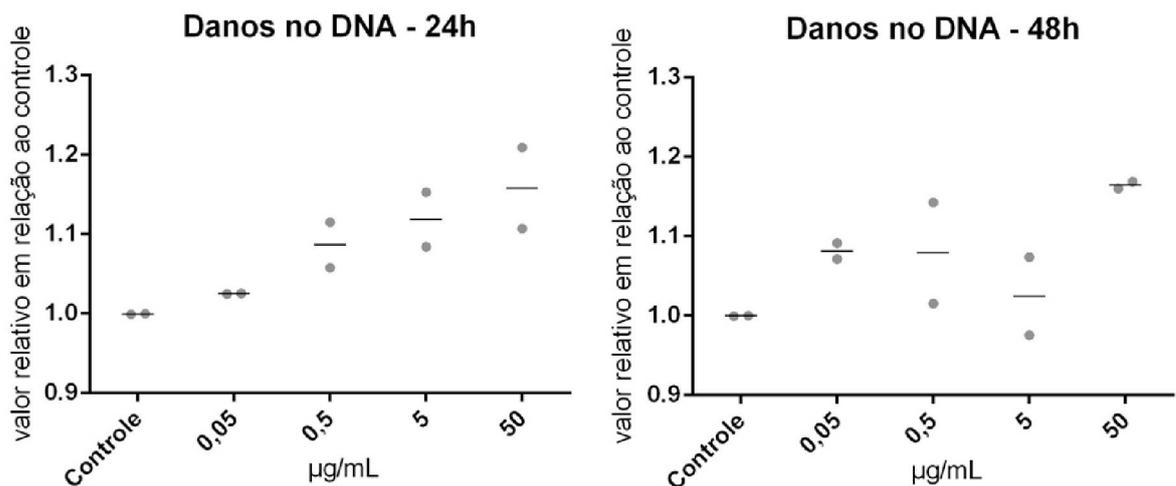


Gráfico 12. Danos no DNA após 24 e 48 h de exposição às BiNPs. Réplicas (pontos) e média (linha horizontal). Não houve diferença significativa em relação ao grupo controle. Dois experimentos independentes.

Nota-se pelos resultados que pode estar havendo dano no DNA nas células *Raw 264.7* expostas às BiNPs conforme as concentrações aumentam (figura 9), não confirmado estatisticamente provavelmente pelo N insuficiente, sendo que há necessidade de outro experimento para confirmar se a exposição está causando danos no DNA das células.

Os mecanismos que levam a danos no DNA geralmente estão relacionados ao excesso de EROs, que sobrecarregam o sistema de defesa antioxidante. Os radicais livres, como radical hidroxila e oxigênio singlete, podem oxidar biomoléculas celulares, causando modificações oxidativas no DNA, como quebras na dupla fita e oxidação de bases nitrogenadas (WAN *et al.*, 2012).

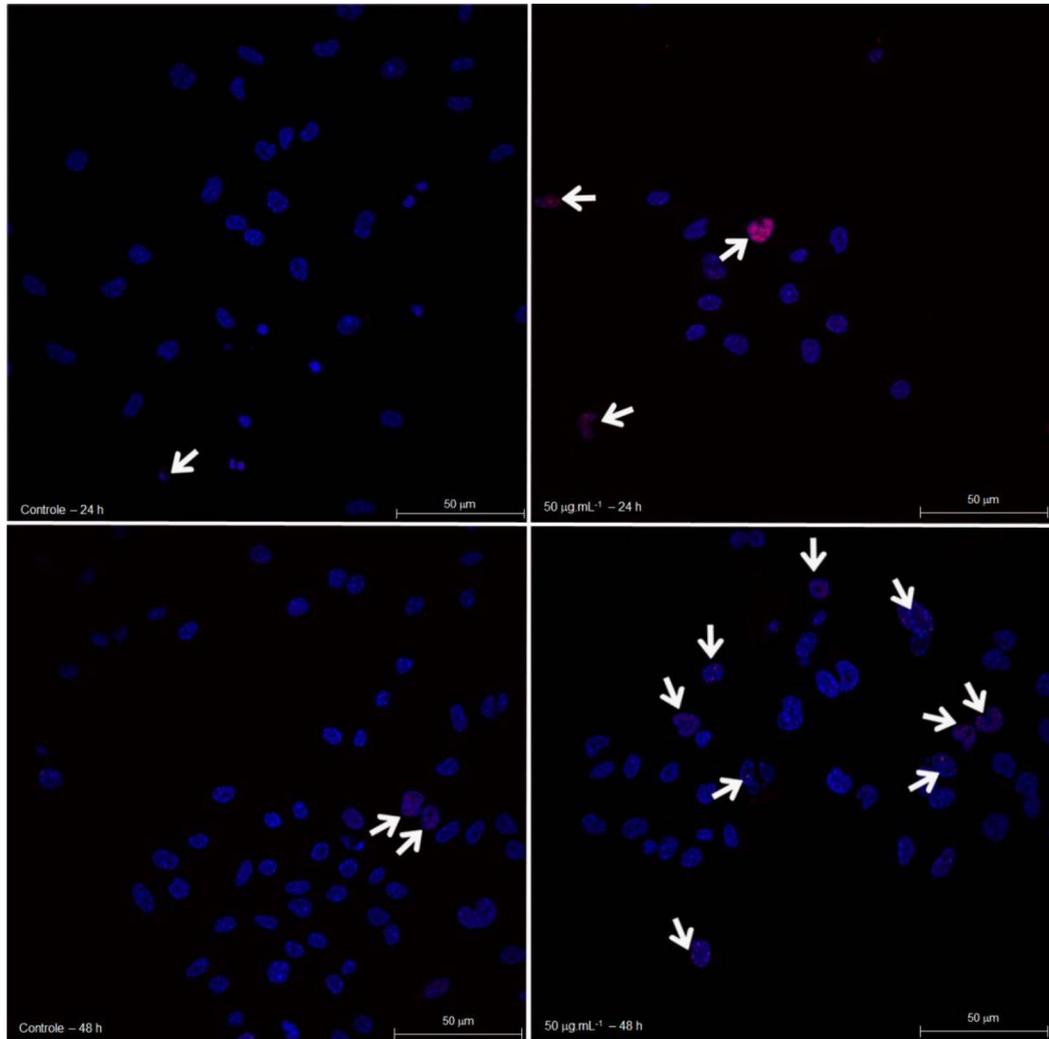


Figura 8. Fotomicrografias de células *Raw 264.7* com o núcleo marcado em azul (DAPI) e focos de reparo de danos no DNA (setas) marcados em vermelho (anti-fosfo-H2AX de camundongo conjugada com Alexa Fluor 488).

Estudos mostram que outras NPs metálicas são capazes de gerar danos no DNA. Nguyen *et al.* (2016) observaram que a exposição de macrófagos *J774A.1*⁹ a NPs de prata geram 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG), marcador mais comum de danos oxidativos no DNA. Não é esperado encontrar esse tipo de dano no DNA nas células *Raw 264.7* expostas a BiNPs, visto que não foi observada alteração significativa de EROS. Hashimoto e Imazato (2015) observaram que NPs de óxido

⁹ A linhagem *J774A.1* foi isolada de ascite de camundongo.

de alumínio também causam danos no DNA de células *Raw 264.7* e relata que esses efeitos se dão principalmente por consequência da interação dessas NPs com outras organelas e secundariamente por interação direta da NP com o DNA, não sendo detalhado como a interação direta gerou dano.

8 CONCLUSÃO

Foi verificado no presente estudo que macrófagos da linhagem *Raw 264.7*, quando expostos à concentração de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de BiNPs, tem alguns parâmetros alterados, sendo observado redução na capacidade de converter MTT em formazan e adesão celular além de aumento da capacidade fagocítica. Contudo, não houve rupturas na membrana, redução da proliferação e nem alterações nos níveis de EROs e ERNs nas células expostas. Como a capacidade fagocítica aumentou consideravelmente tanto em 24 quanto em 48 h de exposição, esse estudo sugere que as BiNPs podem causar imunotoxicidade ao influenciar em respostas principalmente pró-inflamatórias.

9 PERSPECTIVAS FUTURAS

Para prosseguir com a investigação da imunotoxicidade de BiNPs, usando como modelo de estudo macrófagos murinos *Raw 264.7*, pode-se:

- Quantificar os níveis de EROs no ambiente extracelular com o propósito de confirmar se realmente os níveis não encontram-se alterados, descartando ou não o envolvimento dessas moléculas nos processos que levam à citotoxicidade.
- Investigar o tipo de interação que leva a perda de adesão nas células expostas.
- Investigar a(s) via(s) de sinalização que as BiNPs poderiam estar interferindo para alterar os parâmetros celulares, como aumento na atividade fagocítica.

10 REFERÊNCIAS

- ABUDAYYAK, M.; ÖZTAŞ, E.; ARICI, M.; ÖZHAN, G. Investigation of the toxicity of bismuth oxide nanoparticles in various cell lines. **Chemosphere**, v. 169, p. 117-123, Feb 2017. ISSN 1879-1298.
- AKPINAR, Z.; AKAY, S.; UNSAL, B. Improving the standard sequential treatment of *Helicobacter pylori* with either extended treatment or by adding bismuth. **Arab Journal of Gastroenterology**, v. 18, n. 2, p. 58-61, 2017/06/01/ 2017. ISSN 1687-1979.
- ATCC. American Type Culture Collection. 2016. Disponível em: < <http://www.atcc.org/products/all/CRL-6475.aspx> >. Acesso em: jun/2018.
- BABIOR, B. M. Phagocytes and oxidative stress. **Am J Med**, v. 109, n. 1, p. 33-44, Jul 2000. ISSN 0002-9343.
- BAHADAR, H.; MAQBOOL, F.; NIAZ, K.; ABDOLLAHI, M. Toxicity of Nanoparticles and an Overview of Current Experimental Models. **Iran Biomed J**, v. 20, n. 1, p. 1-11, 2016. ISSN 2008-823X.
- BARCIKOWSKI, S.; COMPAGNINI, G. Advanced nanoparticle generation and excitation by lasers in liquids. **Phys Chem Chem Phys**, v. 15, n. 9, p. 3022-6, Mar 2013. ISSN 1463-9084.
- BEZERRA, A. G.; CAVASSIN, P.; MACHADO, T. N.; WOISKI, T. D.; CAETANO, R.; SCHREINER, W. H. Surface-enhanced Raman scattering using bismuth nanoparticles: a study with amino acids. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 19, n. 11, p. 362, 2017/11/02 2017. ISSN 1572-896X.
- BI, D. et al. Alginate enhances Toll-like receptor 4-mediated phagocytosis by murine RAW264.7 macrophages. **Int J Biol Macromol**, v. 105, n. Pt 2, p. 1446-1454, Dec 2017. ISSN 1879-0003.
- BROWN, A. L.; GOFORTH, A. M. pH-Dependent Synthesis and Stability of Aqueous, Elemental Bismuth Glyconanoparticle Colloids: Potentially Biocompatible X-ray Contrast Agents. **Chemistry of Materials**, v. 24, n. 9, p. 1599-1605, 2012/05/08 2012. ISSN 0897-4756.
- BUCHI, D. D. F.; SOUZA, W. Internalization of surface components during ingestion of *Saccharomyces cerevisiae* by macrophages **Journal of submicroscopic cytology and pathology**, v. 24, p. 135-141, 1992.
- BYLUND, J.; BROWN, K. L.; MOVITZ, C.; DAHLGREN, C.; KARLSSON, A. Intracellular generation of superoxide by the phagocyte NADPH oxidase: How, where, and what for? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, n. 12, p. 1834-1845, 2010/12/15/ 2010. ISSN 0891-5849.
- CABRAL-ROMERO, C.; SHANKARARAMAN, C. Bismuth nanoparticles: antimicrobials of broad-spectrum, low cost and safety. **Nanomedicine**: 430-438 p. 2014.
- CARPENTER, D. K. Dynamic Light Scattering with Applications to Chemistry, Biology, and Physics (Berne, Bruce J.; Pecora, Robert). **Journal of Chemical Education**, v. 54, n. 10, p. A430, 1977/10/01 1977. ISSN 0021-9584.
- CECCHINI, M. J.; AMIRI, M.; DICK, F. A. Analysis of cell cycle position in mammalian cells. **J Vis Exp**, n. 59, 2012. ISSN 1940-087X.
- CHAPMAN, J. R.; TAYLOR, M. R.; BOULTON, S. J. Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice. **Mol Cell**, v. 47, n. 4, p. 497-510, Aug 2012. ISSN 1097-4164.
- CHEN, Q.; WANG, N.; ZHU, M.; LU, J.; ZHONG, H.; XUE, X.; GUO, S.; LI, M.; WEI, X.; TAO, Y.; YIN, H. TiO₂ nanoparticles cause mitochondrial dysfunction, activate inflammatory responses, and attenuate phagocytosis in macrophages: A proteomic and metabolomic insight. **Redox Biol**, v. 15, p. 266-276, May 2018. ISSN 2213-2317.
- DA SILVA, N. I. O.; SALVADOR, E. A.; RODRIGUES FRANCO, I.; DE SOUZA, G. A. P.; DE SOUZA MORAIS, S. M.; PRADO ROCHA, R.; DIAS NOVAES, R.; PAIVA CORSETTI, P.; MALAQUIAS, L. C. C.; LEOMIL COELHO, L. F. Bovine serum albumin nanoparticles induce histopathological changes and inflammatory cell recruitment in the skin of treated mice. **Biomed Pharmacother**, v. 107, p. 1311-1317, Nov 2018. ISSN 1950-6007.

- DENG, J.; XU, S.; HU, W.; XUN, X.; ZHENG, L.; SU, M. Tumor targeted, stealthy and degradable bismuth nanoparticles for enhanced X-ray radiation therapy of breast cancer. **Biomaterials**, v. 154, p. 24-33, Feb 2018. ISSN 1878-5905.
- DESCOTES, J. Importance of immunotoxicity in safety assessment: a medical toxicologist's perspective. **Toxicology Letters**, v. 149, n. 1–3, p. 103-108, 4/1/ 2004. ISSN 0378-4274.
- EL-BATAL, A. I.; EL-SAYYAD, G. S.; EL-GHAMRY, A.; AGAYPI, K. M.; ELSAYED, M. A.; GOBARA, M. Melanin-gamma rays assistants for bismuth oxide nanoparticles synthesis at room temperature for enhancing antimicrobial, and photocatalytic activity. **J Photochem Photobiol B**, v. 173, p. 120-139, Aug 2017. ISSN 1873-2682.
- EPA. Nanotechnology White Paper. US Environmental Protection Agency Report EPA 100/B-07/001. Washington, 2007. Disponível em: < <http://www.epa.gov> >. Acesso em: jun/2018.
- ERDEN, A.; KARAHAN, S.; BULUT, K.; BASAK, M.; ASLAN, T.; CETINKAYA, A.; KARAGOZ, H.; AVCI, D. A case of bismuth intoxication with irreversible renal damage. **Int J Nephrol Renovasc Dis**, v. 6, p. 241-3, 2013. ISSN 1178-7058.
- FERREIRA, L. A.; A., R.; O., P. G.; B., V. M.; R., O. M.; B., D. J. M. Endocitose e tráfego intracelular de nanomateriais. **Acta Farmacêutica Portuguesa**, Campinas, SP, 2014.
- FRÖHLICH, E. The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. **Int J Nanomedicine**, v. 7, p. 5577-91, 2012. ISSN 1178-2013.
- GILLIES, R. J.; DIDIER, N.; DENTON, M. Determination of cell number in monolayer cultures. **Anal Biochem**, v. 159, n. 1, p. 109-13, Nov 1986. ISSN 0003-2697.
- GLINSKI, A.; LIEBEL, S.; PELLETIER, È.; VOIGT, C. L.; RANDI, M. A.; CAMPOS, S. X.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; FILIPAK NETO, F. Toxicological interactions of silver nanoparticles and organochlorine pesticides in mouse peritoneal macrophages. **Toxicol Mech Methods**, v. 26, n. 4, p. 251-9, May 2016. ISSN 1537-6524.
- GRANATA, F.; FRATTINI, A.; LOFFREDO, S.; DEL PRETE, A.; SOZZANI, S.; MARONE, G.; TRIGGIANI, M. Signaling events involved in cytokine and chemokine production induced by secretory phospholipase A2 in human lung macrophages. **Eur J Immunol**, v. 36, n. 7, p. 1938-50, Jul 2006. ISSN 0014-2980.
- HARDY, A. et al. Guidance on risk assessment of the application of nanoscience and nanotechnologies in the food and feed chain: Part 1, human and animal health. **EFSA Journal**, v. 16, n. 7, p. e05327, 2018.
- HASHIMOTO, M.; IMAZATO, S. Cytotoxic and genotoxic characterization of aluminum and silicon oxide nanoparticles in macrophages. **Dental Materials**, v. 31, n. 5, p. 556-564, 2015/05/01/ 2015. ISSN 0109-5641.
- HERNANDEZ-DELGADILLO, R.; VELASCO-ARIAS, D.; MARTINEZ-SANMIGUEL, J. J.; DIAZ, D.; ZUMETA-DUBE, I.; AREVALO-NIÑO, K.; CABRAL-ROMERO, C. Bismuth oxide aqueous colloidal nanoparticles inhibit *Candida albicans* growth and biofilm formation. **Int J Nanomedicine**, v. 8, p. 1645-52, 2013. ISSN 1178-2013.
- HERNANDEZ-DELGADILLO, R.; DEL ANGEL-MOSQUEDA, C.; SOLÍS-SOTO, J. M.; MUNGUÍA-MORENO, S.; PINEDA-AGUILAR, N.; SÁNCHEZ-NÁJERA, R. I.; CHELLAM, S.; CABRAL-ROMERO, C. Antimicrobial and antibiofilm activities of MTA supplemented with bismuth lipophilic nanoparticles. **Dent Mater J**, v. 36, n. 4, p. 503-510, Jul 2017. ISSN 1881-1361.
- HILLAIREAU, H.; COUVREUR, P. Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. **Cell Mol Life Sci**, v. 66, n. 17, p. 2873-96, Sep 2009. ISSN 1420-9071.
- IŞLEK, I.; UYSAL, S.; GÖK, F.; DÜNDARÖZ, R.; KÜÇÜKÖDÜK, S. Reversible nephrotoxicity after overdose of colloidal bismuth subcitrate. **Pediatr Nephrol**, v. 16, n. 6, p. 510-4, Jun 2001. ISSN 0931-041X.
- KATO, K.; YAMAMOTO, K.; OKUYAMA, H.; KIMURA, T. Microbicidal activity and morphological characteristics of lung macrophages in *Mycobacterium bovis* BCG cell wall-induced lung granuloma in mice. **Infect Immun**, v. 45, n. 2, p. 325-31, Aug 1984. ISSN 0019-9567.
- KEOGAN, D. M.; GRIFFITH, D. M. Current and potential applications of bismuth-based drugs. **Molecules**, v. 19, n. 9, p. 15258-97, Sep 2014. ISSN 1420-3049.

KOVRIŽNYCH, J. A.; SOTNÍKOVÁ, R.; ZELJENKOVÁ, D.; ROLLEROVÁ, E.; SZABOVÁ, E.; WIMMEROVÁ, S. Acute toxicity of 31 different nanoparticles to zebrafish (*Danio rerio*) tested in adulthood and in early life stages - comparative study. **Interdiscip Toxicol**, v. 6, n. 2, p. 67-73, Jun 2013. ISSN 1337-6853.

KUO, L. J.; YANG, L. X. Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks. **In Vivo**, v. 22, n. 3, p. 305-9, 2008 May-Jun 2008. ISSN 0258-851X.

LASKIN, D. L.; SUNIL, V. R.; FAKHRZADEH, L.; GROVES, A.; GOW, A. J.; LASKIN, J. D. Macrophages, reactive nitrogen species, and lung injury. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1203, p. 60-5, Aug 2010. ISSN 1749-6632.

LIN, P. C.; LIN, S.; WANG, P. C.; SRIDHAR, R. Techniques for physicochemical characterization of nanomaterials. **Biotechnol Adv**, v. 32, n. 4, p. 711-26, 2014 Jul-Aug 2014. ISSN 1873-1899.

LIU, Y.; ZHUANG, J.; ZHANG, X.; YUE, C.; ZHU, N.; YANG, L.; WANG, Y.; CHEN, T.; ZHANG, L. W. Autophagy associated cytotoxicity and cellular uptake mechanisms of bismuth nanoparticles in human kidney cells. **Toxicol Lett**, v. 275, p. 39-48, Jun 2017. ISSN 1879-3169.

LIU, Y.; YU, H.; ZHANG, X.; WANG, Y.; SONG, Z.; ZHAO, J.; SHI, H.; LI, R.; ZHANG, L. W. The protective role of autophagy in nephrotoxicity induced by bismuth nanoparticles through AMPK/mTOR pathway. **Nanotoxicology**, v. 12, n. 6, p. 586-601, 08 2018. ISSN 1743-5404.

MADDEN, A. S.; HOCELLA JR, M. F. A test of geochemical reactivity as a function of mineral size: Manganese oxidation promoted by hematite nanoparticles. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 69, n. 2, p. 389-398, 2005. ISSN 0016-7037.

MANSHIAN, B. B.; POELMANS, J.; SAINI, S.; POKHREL, S.; GREZ, J. J.; HIMMELREICH, U.; MÄDLER, L.; SOENEN, S. J. Nanoparticle-induced inflammation can increase tumor malignancy. **Acta Biomater**, v. 68, p. 99-112, 03 2018. ISSN 1878-7568.

MARCUS, E. A.; SACHS, G.; SCOTT, D. R. Colloidal bismuth subcitrate impedes proton entry into *Helicobacter pylori* and increases the efficacy of growth-dependent antibiotics. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 42, n. 7, p. 922-33, Oct 2015. ISSN 1365-2036.

MISKO, T. P.; SCHILLING, R. J.; SALVEMINI, D.; MOORE, W. M.; CURRIE, M. G. A fluorometric assay for the measurement of nitrite in biological samples. **Anal Biochem**, v. 214, n. 1, p. 11-6, Oct 1993. ISSN 0003-2697.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, Dec 1983. ISSN 0022-1759.

NAM, J.; WON, N.; BANG, J.; JIN, H.; PARK, J.; JUNG, S.; JUNG, S.; PARK, Y.; KIM, S. Surface engineering of inorganic nanoparticles for imaging and therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 5, p. 622-648, 2013/05/01/ 2013. ISSN 0169-409X.

NGUYEN, K. C.; RICHARDS, L.; MASSARSKY, A.; MOON, T. W.; TAYABALI, A. F. Toxicological evaluation of representative silver nanoparticles in macrophages and epithelial cells. **Toxicology in Vitro**, v. 33, p. 163-173, 2016/06/01/ 2016. ISSN 0887-2333.

PANDEY, R. K.; PRAJAPATI, V. K. Molecular and immunological toxic effects of nanoparticles. **Int J Biol Macromol**, v. 107, n. Pt A, p. 1278-1293, Feb 2018. ISSN 1879-0003.

PENG, F.; SETYAWATI, M. I.; TEE, J. K.; DING, X.; WANG, J.; NGA, M. E.; HO, H. K.; LEONG, D. T. Nanoparticles promote in vivo breast cancer cell intravasation and extravasation by inducing endothelial leakiness. **Nat Nanotechnol**, Jan 28 2019. ISSN 1748-3395

POMBO GARCÍA, K.; ZARSCHLER, K.; BARBARO, L.; BARRETO, J. A.; O'MALLEY, W.; SPICCIA, L.; STEPHAN, H.; GRAHAM, B. Zwitterionic-coated "stealth" nanoparticles for biomedical applications: recent advances in countering biomolecular corona formation and uptake by the mononuclear phagocyte system. **Small**, v. 10, n. 13, p. 2516-29, Jul 2014. ISSN 1613-6829.

The Project on Emerging Nanotechnologies. 2019. Disponível em: < <http://www.nanotechproject.org/cpi/search-products/?title=bismuth> >. Acesso em: jan/2019.

- RASCHKE, W. C.; BAIRD, S.; RALPH, P.; NAKOINZ, I. Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. **Cell**, v. 15, n. 1, p. 261-7, Sep 1978. ISSN 0092-8674.
- REILLY, T. P.; BELLEVUE, F. H.; WOSTER, P. M.; SVENSSON, C. K. Comparison of the in vitro cytotoxicity of hydroxylamine metabolites of sulfamethoxazole and dapsone. **Biochem Pharmacol**, v. 55, n. 6, p. 803-10, Mar 1998. ISSN 0006-2952.
- REJMAN, J.; OBERLE, V.; ZUHORN, I. S.; HOEKSTRA, D. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. **Biochem J**, v. 377, n. Pt 1, p. 159-69, Jan 2004. ISSN 1470-8728.
- REUS, T. L.; MACHADO, T. N.; BEZERRA, A. G.; MARCON, B. H.; PASCHOAL, A. C. C.; KULIGOVSKI, C.; DE AGUIAR, A. M.; DALLAGIOVANNA, B. Dose-dependent cytotoxicity of bismuth nanoparticles produced by LASiS in a reference mammalian cell line BALB/c 3T3. **Toxicology in Vitro**, v. 53, p. 99-106, 2018/12/01/ 2018. ISSN 0887-2333.
- SABELLA, S.; CARNEY, R. P.; BRUNETTI, V.; MALVINDI, M. A.; AL-JUFFALI, N.; VECCHIO, G.; JANES, S. M.; BAKR, O. M.; CINGOLANI, R.; STELLACCI, F.; POMPA, P. P. A general mechanism for intracellular toxicity of metal-containing nanoparticles. **Nanoscale**, v. 6, n. 12, p. 7052-61, Jun 2014. ISSN 2040-3372.
- SHACKELFORD, R. E.; KAUFMANN, W. K.; PAULES, R. S. Cell cycle control, checkpoint mechanisms, and genotoxic stress. **Environ Health Perspect**, v. 107 Suppl 1, p. 5-24, Feb 1999. ISSN 0091-6765.
- SHANG, L.; NIENHAUS, K.; NIENHAUS, G. U. Engineered nanoparticles interacting with cells: size matters. **J Nanobiotechnology**, v. 12, p. 5, Feb 2014. ISSN 1477-3155.
- SIGNORI, A. M. Desenvolvimento de uma Nova Metodologia para Preparação de Nanopartículas de Prata Estabilizadas pela Polietilenoimina Funcionalizada e Aplicação em Catálise. 2010. UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA - UFSC, Florianópolis.
- SOX, T. E.; OLSON, C. A. Binding and killing of bacteria by bismuth subsalicylate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 33, n. 12, p. 2075, 1989.
- STEWART, C.; KONSTANTINOV, K.; MCKINNON, S.; GUATELLI, S.; LERCH, M.; ROSENFELD, A.; TEHEI, M.; CORDE, S. First proof of bismuth oxide nanoparticles as efficient radiosensitisers on highly radioresistant cancer cells. **Phys Med**, v. 32, n. 11, p. 1444-1452, Nov 2016. ISSN 1724-191X.
- STROBER, W. Trypan blue exclusion test of cell viability. **Curr Protoc Immunol**, v. Appendix 3, p. Appendix 3B, May 2001. ISSN 1934-368X.
- TEIXEIRA ROSA, R. G. Caracterização de nanopartículas de Bi produzidas por ablação a laser. 2014. (Mestrado). Setor de Tecnologia, Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais, Universidade Federal do Paraná, PR, Brasil.
- TORRISI, L.; SILIPIGNI, L.; RESTUCCIA, N.; CUZZOCREA, S.; CUTRONEO, M.; BARRECA, F.; FAZIO, B.; DI MARCO, G.; GUGLIELMINO, S. Laser-generated bismuth nanoparticles for applications in imaging and radiotherapy. **Journal of Physics and Chemistry of Solids**, v. 119, p. 62-70, 2018/08/01/ 2018. ISSN 0022-3697.
- VANCE, M. E.; KUIKEN, T.; VEJERANO, E. P.; MCGINNIS, S. P.; HOHELLA, M. F.; REJESKI, D.; HULL, M. S. Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. **Beilstein J Nanotechnol**, v. 6, p. 1769-80, 2015. ISSN 2190-4286.
- VEGA-AVILA, E.; PUGSLEY, M. K. An overview of colorimetric assay methods used to assess survival or proliferation of mammalian cells. **Proc West Pharmacol Soc**, v. 54, p. 10-4, 2011. ISSN 0083-8969.
- VINLUAN, R. D., 3RD; ZHENG, J. Serum protein adsorption and excretion pathways of metal nanoparticles. **Nanomedicine (Lond)**, v. 10, n. 17, p. 2781-94, 2015. ISSN 1748-6963.
- WAN, R.; MO, Y.; FENG, L.; CHIEN, S.; TOLLERUD, D. J.; ZHANG, Q. DNA damage caused by metal nanoparticles: involvement of oxidative stress and activation of ATM. **Chem Res Toxicol**, v. 25, n. 7, p. 1402-11, Jul 2012. ISSN 1520-5010.
- WANG, Y.; WANG, B.; ZHU, M.-T.; LI, M.; WANG, H.-J.; WANG, M.; OUYANG, H.; CHAI, Z.-F.; FENG, W.-Y.; ZHAO, Y.-L. Microglial activation, recruitment and phagocytosis as linked

phenomena in ferric oxide nanoparticle exposure. **Toxicology Letters**, v. 205, n. 1, p. 26-37, 2011/08/10/ 2011. ISSN 0378-4274.

WEI, X. L.; MO, Z. H.; LI, B.; WEI, J. M. Disruption of HepG2 cell adhesion by gold nanoparticle and Paclitaxel disclosed by in situ QCM measurement. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 59, n. 1, p. 100-4, Sep 1 2007. ISSN 0927-7765.

WINK, D. A.; HINES, H. B.; CHENG, R. Y.; SWITZER, C. H.; FLORES-SANTANA, W.; VITEK, M. P.; RIDNOUR, L. A.; COLTON, C. A. Nitric oxide and redox mechanisms in the immune response. **J Leukoc Biol**, v. 89, n. 6, p. 873-91, Jun 2011. ISSN 1938-3673.

WU, D.; YOTNDA, P. Production and detection of reactive oxygen species (ROS) in cancers. **J Vis Exp**, n. 57, Nov 2011. ISSN 1940-087X.

WU, X.; HE, X.; WANG, K.; XIE, C.; ZHOU, B.; QING, Z. Ultrasmall near-infrared gold nanoclusters for tumor fluorescence imaging in vivo. **Nanoscale**, v. 2, n. 10, p. 2244-9, Oct 2010. ISSN 2040-3372.

ZHA, S.; SEKIGUCHI, J.; BRUSH, J. W.; BASSING, C. H.; ALT, F. W. Complementary functions of ATM and H2AX in development and suppression of genomic instability. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 27, p. 9302-6, Jul 2008. ISSN 1091-6490.