

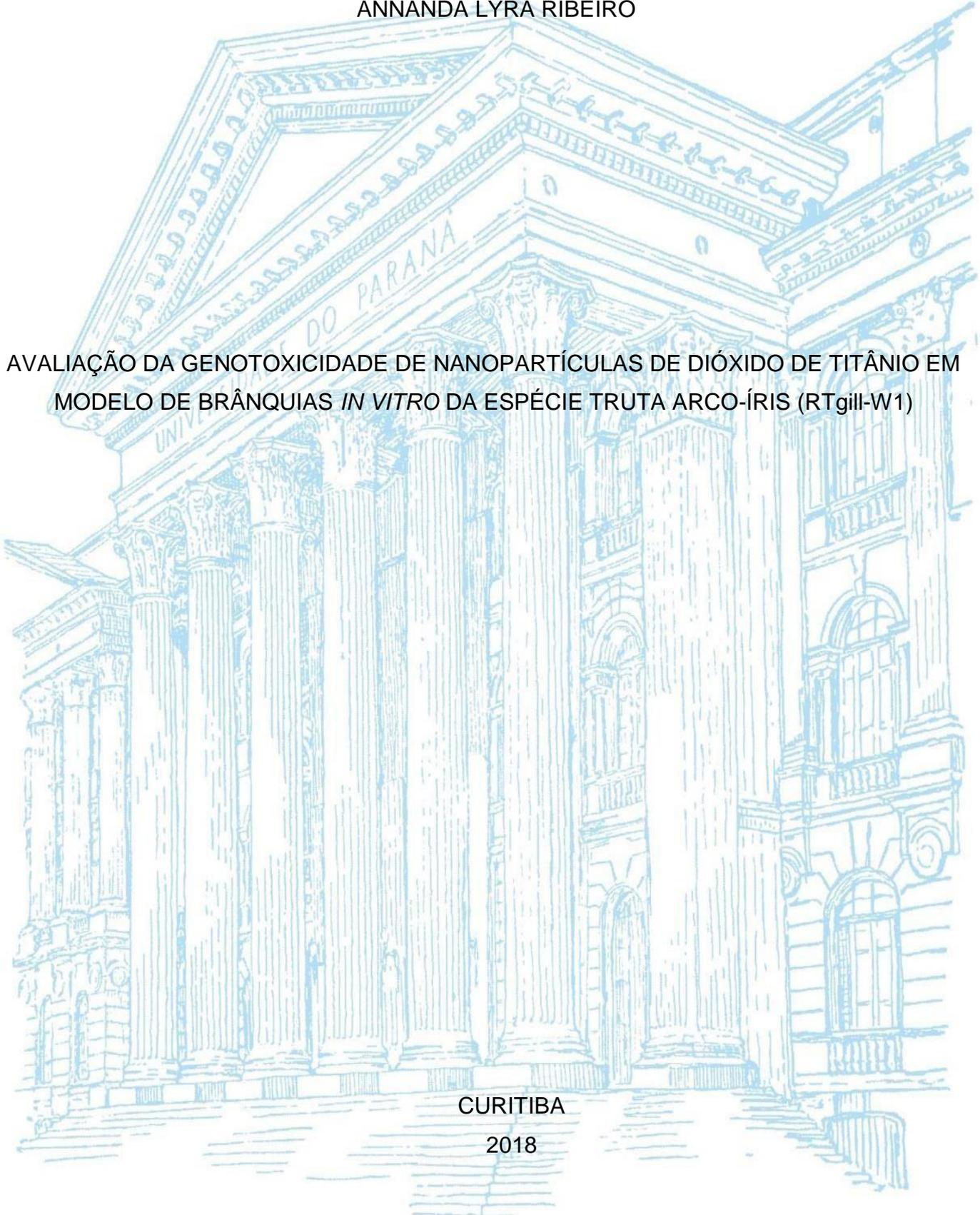
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANNANDA LYRA RIBEIRO

AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE DE NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO EM
MODELO DE BRÂNCIAS *IN VITRO* DA ESPÉCIE TRUTA ARCO-ÍRIS (RTgill-W1)

CURITIBA

2018



ANNANDA LYRA RIBEIRO

**AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE DE NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO
DE TITÂNIO EM MODELO DE BRÂNQUIAS *IN VITRO* DA ESPÉCIE TRUTA
ARCO-ÍRIS (RTgIII-W1)**

Monografia apresentada à disciplina BIO027 Estágio Supervisionado em Biologia II como requisito parcial à obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Marta Margarete Cestari.

Co-orientadora: Dr.^a Taynah Vicari.

CURITIBA

2018

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Ana e Julio, que são a inspiração por trás de todos os meus sonhos. Nem todas as palavras do mundo conseguiriam descrever a gratidão que tenho por vocês dois. Obrigada por tudo. Amo vocês!

Aos meus irmãos, Anna Julia e Gabriel, que sempre estiveram por perto e acompanharam cada passo dessa trajetória. Aos meus irmãos de quatro patas: Sansão, Mel e Chico por terem feito companhia aos meus pais enquanto eu estive fora.

À Prof^a. Dr^a. Marta Margarete Cestari por toda confiança depositada em mim e por sempre acreditar no meu potencial. As professoras da banca, Daniela Leme e Luciane Viater, por aceitarem com carinho meu convite.

Em especial, agradeço a minha co-orientadora Taynah Vicari, que fez com que todo esse trabalho fosse possível. Obrigada por toda a dedicação, paciência e tempo que despendeu para poder me acompanhar nos meus experimentos. Aos meus olhos, você é e sempre será admirada como mulher e cientista.

Aos meus amigos da graduação, que estiveram presentes nos momentos bons e nem tão bons assim dessa jornada. Lia, Lucas, Luiz Ricardo e Pedro, obrigada por todas as risadas, piadas e problemas compartilhados. Essa vitória também é de vocês.

Aos meus amigos do ensino médio que me conheceram muito antes de eu sonhar em estar onde estou hoje. Com vocês eu compartilhei minhas dúvidas, minhas alegrias e cada passo da trajetória antes e durante a faculdade. Me orgulho de ver que tomamos rumos diferentes, mas que a amizade ainda permanece intacta. Victor, Isabela, Luana, Sara, Bruna e Flávia, vocês são um pedacinho de tudo isso.

Por último, mas não menos importante, agradeço do fundo do meu coração ao meu namorado, Rafael. Você acompanhou essa jornada desde o princípio e ouviu todas as minhas angústias e preocupações antes e durante a graduação. Obrigada por tudo.

RESUMO

As nanopartículas de dióxido de titânio (NP TiO_2) são matéria prima na fabricação de filtros solares, cosméticos e tintas. No entanto, a toxicidade causada em espécies aquáticas pelo despejo das NP TiO_2 no ambiente ainda não é muito claro. As brânquias são o principal órgão de entrada de contaminantes aquáticos, uma vez que estão em contato constante com os corpos hídricos. Portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a genotoxicidade de três concentrações de nanopartículas de dióxido de titânio (0.1, 1.0 e 10.0 $\mu\text{g/mL}$) na linhagem celular epitelial de brânquia (RTgill-W1) do peixe truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) por meio do ensaio cometa alcalino. A RTgill-W1 foi cultivada em meio de cultura L-15 com vermelho de fenol em condições controladas de temperatura e esterilidade. Foram realizados ao todo 5 tratamentos: controle negativo (meio L-15), NP1 (0.1 $\mu\text{g/mL}$), NP2 (1.0 $\mu\text{g/mL}$), NP3 (10.0 $\mu\text{g/mL}$) e controle positivo (MMS 0.5 mM). As células foram expostas aos tratamentos durante o período de 3 horas. A NP3 não apresentou diferença quando comparada ao controle negativo. Apenas a NP1 e a NP2 foram significativas em relação ao controle negativo ($p < 0.05$), sendo assim consideradas genotóxicas. Devido ao tamanho dos aglomerados produzidos serem menores em relação à maior concentração empregada, as NP1 e NP2 apresentaram mais facilidade para ultrapassarem as barreiras celulares e nucleares, produzindo assim os resultados genotóxicos observados na linhagem celular RTgill-W1.

Palavras-chave: peixes; linhagem celular; contaminantes aquáticos; nanopartículas de dióxido de titânio; RTgill-W1.

ABSTRACT

Titanium dioxide nanoparticles (NPTiO₂) are used as main raw material in the manufacturing of sunscreen, cosmetics and inks. However, their toxicity to aquatic species caused by the entering of NPTiO₂ on the aquatic environment is little known. Gills are the main organ of entry of aquatic contaminants since they are constantly in contact with the water bodies. Thus, the main objective of this study was to investigate the genotoxicity of three titanium dioxide concentrations (0.1, 1.0 e 10.0 µg/mL) on the epithelial cell line from the gill (RTgill-W1) of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) through the alkaline comet assay. RTgill-W1 cells were maintained in Leibovitz L-15 medium with phenol red and kept under controlled conditions such as temperature and sterility. In all, there were five treatments: negative control (L-15 medium), NP1 (0.1 µg/mL), NP2 (1.0 µg/mL), NP3 (10.0 µg/mL) and positive control (MMS 0.5 mM). The cells were exposed to all treatments during 3 hours. NP3 were not statistically significant when compared to negative control. Only NP1 and NP2 were statistically significant (p<0.05), being considered genotoxic. Possible, the size of the agglomerates produced by NP1 and NP2 were smaller than agglomerates produced by NP3. Therefore, NP1 and NP1 were easier to overcome the cellular and nuclear barriers, causing the genotoxic effects observed in RTgill-W1 cell line.

Key-words: fishes; cell lines; aquatic contaminants; titanium dioxide nanoparticles; RTgill-W1.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Exemplar adulto de truta arco-irís (*Oncorhynchus mykiss*). Fonte: <https://www.globalfishmounts.com/rainbow-trout-fishmount-p/ratr.htm> 7
- Figura 2: Nucleóides de RTgill-W1 após a realização do ensaio cometa. O valor de dano 0 indica a ausência de danos, ao passo que o dano 4 corresponde a presença de alta taxa de dano no DNA. Fonte: a autora..... 14
- Figura 3: Caracterização da nanopartícula de dióxido de titânio. (A) Eletromicrografia de NPTiO₂ em escala de 100 nm. (B) Gráfico com informações sobre tamanho médio de NPTiO₂ em pó. Fonte: a autora 15
- Figura 4: Morfologia epitelial da linhagem RTgill-W1 na segunda passagem após descongelamento (aumento de 40x). Fonte: a autora..... 16
- Figura 5: Comparação dos danos ao DNA entre todos os tratamentos (CN, NP1, NP2, NP3 e CP). Os asteriscos indicam as concentrações genotóxicas...Fonte: a autora. 17

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características avaliadas pelo aparelho Zeta sizer®, das três suspensões coloidais de nanopartículas de dióxido de titânio nas concentrações de 0.1 µg /mL; 1 µg /mL e 10.0 µg/mL. Fonte: a autora. 15

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 CONTAMINANTES EMERGENTES	2
1.1.1 NANOPARTÍCULAS	2
1.1.1.1 NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO (NPTIO ₂).....	3
1.2 MÉTODOS ALTERNATIVOS À EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL.....	5
1.3 LINHAGEM EPITELIAL DE BRÂNQUIA DE TRUTA ARCO ÍRIS - <i>RTgill-W1</i>	6
1.4 BIOMARCADORES GENÉTICOS	7
1.4.1 ENSAIO COMETA	8
2. OBJETIVOS	9
2.1 OBJETIVO GERAL	9
2.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
3. MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1 MATERIAL	10
3.2 MÉTODOS	10
3.2.1 CULTURA DE CÉLULAS DE BRÂNQUIA (RTgill-W1)	10
3.2.1.1 SUBCULTIVO ROTINEIRO.....	10
3.2.1.2 PLAQUEAMENTO	11
3.3 SOLUÇÕES DE NPTIO ₂	11
3.4 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO	12
3.5 EXPOSIÇÃO ÀS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NPTIO ₂	12
3.6 ENSAIO COMETA	12
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	14
4. RESULTADOS	15
4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO	15
4.2 CULTURA DE CÉLULAS DE BRÂNQUIA (RTgill-W1)	16
4.3 ENSAIO COMETA DAS CÉLULAS RTgill-W1	16
5. DISCUSSÃO	18
6. CONCLUSÃO	22
7. REFERÊNCIAS	23

1. INTRODUÇÃO

Os crescentes avanços tecnológicos empregados na agricultura, na indústria e na geração de energia são necessários para a manutenção da vida na Terra. No entanto, a industrialização em massa é uma das principais responsáveis pelo lançamento de grandes quantidades de resíduos diretamente no ecossistema aquático (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2006). Como consequência, este ambiente corre risco de perda de características naturais específicas do habitat, além de estar propenso à queda da diversidade biológica local (GOULART e CALLISTO, 2003).

Em 2018, a base de dados da *Chemical Abstract Service* (CAS), atingiu a marca de 144 milhões de substâncias químicas cadastradas. Dentre estes compostos, aproximadamente 11 milhões estão disponíveis no mercado, ao passo que 80 mil são utilizados no cotidiano. No entanto, apenas 2 mil dessas substâncias possuem seu mecanismo toxicológico conhecido.

A toxicologia ambiental é o ramo da ciência responsável por investigar os possíveis efeitos adversos resultantes da ação das substâncias químicas sobre organismos vivos. Dentro da toxicologia ambiental, encontra-se a ecotoxicologia – responsável pela identificação dos riscos provenientes de substâncias químicas sob a dinâmica das populações e comunidades de determinado ecossistema (COSTA *et al.*, 2008). Desse modo, a ecotoxicologia aquática envolve o entendimento acerca do transporte, distribuição, transformação e endereçamento final de contaminantes aquáticos, bem como os possíveis efeitos danosos causados por estes (SILVA e SANTOS, 2007).

Por ser o maior grupo de vertebrados presentes no ecossistema aquático, os peixes são amplamente empregados como bioindicadores em ensaios ecotoxicológicos. No entanto, apesar de ser um bom organismo-teste para análise de contaminantes ambientais aquáticos, a realização de ensaios *in vivo* requer um grande número de exemplares para sua execução (TANNEBERGER *et al.*, 2013). Atualmente, a aplicação do conceito dos 3R's (*i.e. Replacement, Reduction and Refinement of Animal Testing*) na toxicologia permite o desenvolvimento de novos modelos *in vitro*, impulsionado cada vez mais a utilização dos métodos alternativos a experimentação

animal na pesquisa e na indústria.

1.1 CONTAMINANTES EMERGENTES

Os contaminantes emergentes são caracterizados como substâncias potencialmente tóxicas presentes nos ecossistemas que tem seu mecanismo de ação pouco compreendido e são encontrados em pequenas quantidades no ambiente, não se enquadrando assim nas normativas, legislações ou diretrizes de monitoramento ambientais existentes atualmente (ABQ; EPA; GEISSEN *et al.*, 2015; LEI *et al.*, 2015).

A presença dos contaminantes emergentes no meio ambiente ocorre principalmente por meio do despejo de efluentes em águas residuais urbanas. A grande preocupação acerca desses compostos são os possíveis impactos ecológicos que podem causar no ecossistema no qual estão presentes (PETRIE *et al.*, 2015). Dentre as principais classes de compostos que são ou podem conter contaminantes emergentes, encontram-se os desreguladores endócrinos (por exemplo, hormônios como 17 β -estradiol e 17 α -etilenoestradiol); medicamentos (analgésicos, antidepressivos, antibióticos e β -bloqueadores); produtos de higiene pessoal (shampoos, cremes faciais e enxaguantes bucais) e as nanopartículas (HOUTMAN, 2010).

1.1.1 NANOPARTÍCULAS

São consideradas nanopartículas (NPs) os materiais que apresentam pelo menos uma de suas dimensões entre 1 e 100 nm (KHAN *et al.*, 2017). As NPs podem ser agrupadas em diferentes classes de acordo com suas propriedades, formas e tamanhos. Dentre as principais categorias destacam-se os nanomateriais a base de carbono (fulerenos e nanotubos de carbono), semicondutores (*quantum dots*), nanomateriais metálicos (nanopartículas de ouro e prata), nanomateriais orgânicos poliméricos, nanomateriais óxido metálicos (por exemplo, nanopartículas de sílica e de

dióxido de titânio) e nanomateriais cerâmicos (*WHITE BOOK ON NANOTECHNOLOGY*, 2008; KHAN *et al.*, 2017).

O grande atrativo das nanopartículas para a indústria e para a tecnologia são suas propriedades físico-químicas diferenciadas, como ampla superfície de contato e alta capacidade de penetração. No entanto, os impactos causados por essas características químicas ainda não são bem compreendidos, assim como os possíveis danos aos seres vivos (OBERDÖRSTER, MAYNARD e DONALDSON, 2005). Ainda assim, as NPs vêm sendo cada vez mais utilizadas na construção civil, em cosméticos e produtos de higiene pessoal, além de serem aplicadas também na pesquisa, na indústria e na medicina (*TECHNICAL FACT SHEET – NANOMATERIALS*, EPA 2017). Devido à intensa demanda de produtos à base de nanomateriais manufaturados, estima-se que a produção desses compostos cresça mais de meio milhão de toneladas por ano até 2020 (CANESI *et al.*, 2015).

1.1.1.1 NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO (NPTiO₂)

O dióxido de titânio é um óxido de ocorrência natural, sendo conhecido também como óxido de titânio ou titânia. Pode ser encontrado em três formas diferentes na natureza: anatase, rutilo e broquite (MENARD *et al.*, 2011), sendo a forma anatase considerada a mais tóxica. Estima-se que entre os anos de 1916 e 2011, cerca de 170 mil toneladas de dióxido de titânio bruto e na forma nanoparticulada foram produzidos mundialmente (JOVANOVIĆ, 2015).

As nanopartículas de dióxido de titânio (NPTiO₂) são especialmente conhecidas por suas propriedades fotocatalíticas. Isso significa que quando ativadas por quantidade suficiente de energia, são capazes de formar radicais livres que promovem o estresse oxidativo e danificam as células que estão em contato com a nanopartícula (FUJISHIMA, *et al.*, 2000; MILLS e LEE, 2002; SHARMA, 2009). Embora a absorvância seja diferente para as diferentes formas de TiO₂, acredita-se que a grande maioria absorva radiação UVA (320–400 nm) e UVB (290–320 nm), por isso são amplamente utilizadas na fabricação de filtros solares. Em meio aquoso, as NPTiO₂ produzem radicais livres quando

ativadas pela luz UV sendo estes radicais capazes que danificar bactérias, conferindo assim propriedades antimicrobianas ao dióxido de titânio, que vem sendo empregadas na indústria médica, alimentícia e no tratamento de águas residuais. Podem ainda ser utilizados na fabricação de materiais de construção, capacitores e equipamentos esportivos. Com o aumento do uso das NPTiO_2 para fabricação de bens de consumo, torna-se cada vez mais provável sua dispersão no ambiente aquático, seja por meio do uso, despejo ou degradação pós uso (HAYNES *et al.*, 2017).

Outras propriedades físico químicas como pH, força iônica e matéria orgânica podem interferir no comportamento e destino final das NPTiO_2 no ecossistema aquático (ZHANG *et al.*, 2012). Na presença de fonte de carbono (matéria orgânica) associada com radiação UV, as nanopartículas de dióxido de titânio atuam como catalisadores da síntese de espécies reativas de oxigênio, sendo esta propriedade toxicologicamente relevante ao que se refere ao estresse oxidativo na biota (GURR *et al.*, 2005)

Os organismos presentes no ecossistema aquático podem ser afetados pela pós-degradação de produtos à base de NPTiO_2 . Na água, as nanopartículas de dióxido de titânio podem ser absorvidas pelas brânquias, pele e intestino de peixes, podendo também ser incorporadas por meio da dieta (HANDY *et al.*, 2008). Diversos estudos relatam os impactos causados pela presença das NPTiO_2 nos peixes (JOVANOVIC *et al.*, 2013; HAYNES *et al.*, 2017; HU *et al.*, 2017) e os possíveis danos causados pela associação com outros compostos químicos, sendo o estresse oxidativo o principal mecanismo descrito e responsável pela indução de danos ao DNA (BORAN *et al.*, 2016; MANSOURI *et al.*, 2016; FANG *et al.*, 2015; MIRANDA *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2016). Klingelfus *et al.*, (2018), demonstraram em seu trabalho utilizando a linhagem celular RTG-2, que as nanopartículas de dióxido de titânio são agentes causadores de danos tipo *crosslink* no DNA. O protocolo do ensaio cometa alcalino para identificação deste tipo de dano é baseado em um tratamento combinado entre um agente danoso ao DNA e um *crosslinker*, geralmente, o formaldeído, seguido pela mensuração da porcentagem de DNA na cauda no cometa. Quando presentes, os agentes *crosslinkers* promovem a diminuição da migração do DNA no tratamento combinado com o indutor de danos.

1.2 MÉTODOS ALTERNATIVOS À EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Estima-se que em 2013, aproximadamente 3 milhões de peixes foram empregados para experimentação somente nos Estados Unidos (TANNEBERGER *et al.*, 2013). Isso ocorre porque os peixes estão diretamente em contato com os diferentes compostos presentes no ecossistema aquático, caracterizando-os assim como excelentes organismos-teste para ensaios em ecotoxicologia aquática (AUTHMAN *et al.*, 2015). Os experimentos ecotoxicológicos *in vivo* buscam avaliar os impactos de compostos com potencial tóxico em populações e ecossistemas, no entanto, empregam um elevado número de animais para sua realização (CASTÃO *et al.*, 2003).

O princípio dos 3R's (*Replacement, Reduction and Refinement of Animal Testing*) foi introduzido no meio científico em 1959 por Russell e Burch no livro “*The Principles of Humane Experimental Technique*”. De acordo com o RENAMA (Rede Nacional de Métodos Alternativos, 2011), a redução (*Reduction*) significa que menos animais podem ser usados para que se obtenham os mesmos resultados. O refinamento (*Refinement*) garante a minimização da dor e de qualquer estresse ou possível sofrimento causado ao animal na experimentação e a substituição (*Replacement*) defende que o mesmo nível de conhecimento pode ser alcançado sem o emprego de animais vertebrados.

Seguindo esses conceitos, diversos países criaram diretrizes para validação e incentivo de métodos alternativos na pesquisa, dentre eles o ECVAM (*European Centre for the Validation of Alternative Methods*) e o JaCVAM (*Japanese Centre for the Validation of Alternative Methods*). No Brasil, os principais órgãos responsáveis pelo fomento e incentivo as pesquisas alternativas são o RENAMA e o BraCVAM (Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos) – criado em 2013 pelo Instituto Oswaldo Cruz. Existe ainda o CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal), órgão integrante do Ministério da Ciência e da Tecnologia brasileiro, responsável pela elaboração de normativas para a utilização de animais na pesquisa e no ensino, além de estabelecer as diretrizes para funcionamento de biotérios, centro de criação de animais e laboratórios de experimentação animal.

Diversas metodologias alternativas foram desenvolvidas ao longo dos últimos anos, dentre elas, o desenvolvimento de ensaios *in vitro*. O uso de culturas de células apresenta algumas vantagens como ferramenta experimental. Para a pesquisa geral, as culturas permitem que fenômenos celulares sejam estudados em condições controladas e, em alguns casos, em um ambiente completamente definido e independente das complexidades e variabilidades dos sistemas *in vivo* (BOLS *et al.*, 2005). Para a toxicologia, em particular, os métodos *in vitro* conferem as seguintes vantagens: a) permitem que diferentes espécies sejam comparadas em relação a sua sensibilidade a contaminantes ambientais; b) facilidade de acesso aos mecanismos toxicológicos a nível celular e molecular e c) diversas substâncias químicas podem ser testadas simultaneamente (CASTANÕ *et al.*, 2003).

1.3 LINHAGEM EPITELIAL DE BRÂNQUIA DE TRUTA ARCO ÍRIS (*Oncorhynchus mykiss*) - RTgill-W1

As brânquias são órgãos multifuncionais dos organismos aquáticos responsáveis pelas trocas gasosas, osmorregulação, transporte de metais, excreção de nitrogênio e *uptake* de xenobióticos (SCHNELL *et al.*, 2016). Por estar em contato constante com a água, é um dos primeiros órgãos a serem afetados pela exposição a contaminantes e o principal local de captação e absorção de substâncias tóxicas (WOOD *et al.*, 2002).

Entretanto, as brânquias *in vivo* são de difícil obtenção e manipulação. Assim, células das brânquias são consideradas uma alternativa para o estudo de contaminantes aquáticos. A linhagem celular epitelial RTgill-W1 foi isolada a partir da brânquia de exemplares adultos da espécie de peixe *Oncorhynchus mykiss*, conhecida popularmente como truta arco-íris (Figura 1) (BOLS *et al.*, 1994). As linhagens celulares derivadas da brânquia permitem estudos citotóxicos e de biotransformação de compostos químicos de forma muito mais detalhada do que seria possível em ensaios *in vivo*, além de serem de fácil manutenção, manipulação e reprodutibilidade. Uma das grandes vantagens da RTgill-W1 é a possibilidade de exposição direta a amostras de água coletadas do ambiente sem a necessidade de extração de contaminantes ou preparo de soluções (LEE *et al.*, 2008). De fato, a RTgill-W1 foi

empregada para avaliar a toxicidade de efluentes industriais (DAYEH *et al.* 2002), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (SCHIRMER *et al.* 1998 a) e nanopartículas de dióxido de titânio (LAMMEL e STURVE, 2018).

O uso de linhagem celulares apresenta algumas vantagens. Dentre elas, destacam-se a reprodutibilidade - uma vez que todas as células presentes na cultura são do mesmo tipo, eliminando a diferença de células presente no cultivo primário – e a facilidade de manutenção, devido ao fato de não necessitar ser diretamente isolada do órgão de interesse todas as vezes que existe a necessidade do seu uso (CASTANÕ *et al.*, 2003).



Figura 1: Exemplar adulto de truta arco-irís (*Oncorhynchus mykiss*). Fonte: <https://www.globalfishmounts.com/rainbow-trout-fishmount-p/ratr.htm>

1.4 BIOMARCADORES GENÉTICOS

Os biomarcadores genéticos são frequentemente utilizados como ferramenta de identificação e avaliação de impacto de xenobióticos por meio de análises de aberrações cromossômicas, quebras no DNA, formação de micronúcleo e outras alterações cromossômicas nucleares (BOMBAIL *et al.*, 2001). Os biomarcadores

precoces – como é o caso dos biomarcadores genéticos – são capazes de detectar danos prematuros causados por agentes químicos, podendo assim ser aplicados como medida preventiva contra o aparecimento de danos mais severos em populações e comunidades (VAN DER OOST *et al.*, 2003).

1.4.1 ENSAIO COMETA

Também conhecido como *Single-Cell Gel Eletrophoresis* (SCGE), o ensaio do cometa é uma técnica utilizada para detectar danos ao DNA por meio da migração em gel de agarose (FERRARO *et al.*, 2004). O nome ‘cometa’ se refere à longa cauda formada pelos fragmentos de DNA após a passagem de corrente elétrica (BOMBAIL *et al.* 2001).

O princípio do ensaio baseia-se no fato de que as células que contém DNA não danificado migram em conjunto, formando o que chamamos de “cabeça” do cometa. Já os fragmentos danificados, migram pelo gel de acordo com seu tamanho e peso, sendo que os fragmentos menores migram mais rapidamente que os fragmentos maiores. Assim, os diversos fragmentos de diferentes tamanhos correm pelo gel de maneira distinta, formando o que chamamos de “cauda” do cometa (OLIVE; BANÁTH; DURAND, 1990).

No ensaio do cometa alcalino, as lâminas são coradas com brometo de etídio e analisadas em microscópio de fluorescência. A avaliação do dano pode ser feita visualmente, através da atribuição de classificação da extensão da cauda, que vai de 0 a 4 ou com o auxílio de um software através do cálculo da relação entre o raio do núcleo e o comprimento da cauda do cometa (COLLINS *et al.*, 1997).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial genotóxico das nanopartículas de dióxido de titânio (NPTiO₂) na linhagem celular epitelial da brânquia de truta arco-íris (RTgill-W1).

2.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a genotoxicidade das NPTiO₂ nas concentrações de 0.1 µg/mL, 1.0 µg/mL e 10.0 µg/mL utilizando a linhagem celular branquial de truta arco-íris - RTgill-W1, por meio do ensaio cometa.

- Verificar a sensibilidade da linhagem celular às baixas concentrações de NPTiO₂ utilizadas neste estudo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

A linhagem celular RTgill-W1 foi concedida por meio de doação da Professora Elaine M. Faustman da Universidade de Washington, Estados Unidos.

As nanopartículas de dióxido de titânio foram comercialmente adquiridas da marca Sigma-Aldrich® (Titanium IV oxide, anatase, nanopowder <25nm particle size, 99.7% trace metal basis; 637254-50G – CAS: 1317-70-0).

3.2 MÉTODOS

3.2.1 CULTURA DE CÉLULAS DE BRÂNQUIA (RTgill-W1)

A linhagem RTgill-W1 foi cultivada de acordo com o protocolo estabelecido pela ATCC® CRL 2523™ (*American Type Culture Collection*). As células foram cultivadas na temperatura de 20 °C em garrafas de 75 cm² contendo 15 mL de meio de cultura Leibovitz-15 (L-15) com vermelho de fenol suplementado com 10% de soro bovino fetal. O meio de cultura foi trocado a cada dois dias e o subcultivo realizado quando as células atingiram confluência aproximada de 80%.

3.2.1.1 SUBCULTIVO ROTINEIRO

Com as células na confluência ideal, foi realizado o subcultivo. Para tanto, o meio de cultura foi descartado e, em seguida, as células foram lavadas com 10 mL de PBS 1 X concentrado (KCl 2,0 g/L; NaCl 70,1 g/L; Na₂HPO₄, 2H₂O 12,8 g/L; NaH₂PO₄, 1H₂O 4,4 g/L, pH = 7.4). Posteriormente, descartou-se o PBS e adicionou-se 3 mL de tripsina 1 X concentrada. As células foram então incubadas durante 5 minutos na B.O.D na temperatura de 20°C. Ao final desse período, as células foram soltas e a tripsina foi

inativada com 3 mL de meio L-15 completo. A suspensão foi centrifugada durante 5 minutos na velocidade de 1500 rpm para formação do *pellet*. Após o descarte do sobrenadante, o *pellet* foi ressuspensionado em 1 mL de meio L-15 completo. A contagem do número de células foi feita na câmara de Neubauer utilizando-se 10 µL da suspensão celular diluídos em 10 µL do corante *Trypan Blue* para posteriores cálculos de viabilidade celular antes do plaqueamento.

3.2.1.2 PLAQUEAMENTO

As suspensões celulares diluídas em meio L-15 (7×10^4 células por mL) foram colocadas em placas de 24 poços com tratamento prévio para adesão celular. Cada poço foi completado com meio L-15 até atingir o volume total de 2 mL. As placas foram incubadas *overnight* em uma incubadora BOD na temperatura de 20°C para posterior realização da exposição as nanopartículas de dióxido de titânio, sendo a exposição realizada 24 horas após o plaqueamento.

3.3 SOLUÇÕES DE NPTiO₂

Para a exposição à RTgill-W1, foi preparada uma solução estoque de NPTiO₂ na concentração de 50 µg/mL em meio L-15 com vermelho de fenol. A suspensão de estoque foi então sonicada durante 30 minutos em um banho ultrassônico (marca: Schuster®). A partir desta solução, foram preparadas as soluções de nanopartículas nas concentrações de 0.1 µg/mL (NP1), 1.0 µg/mL (NP2) e 10.0 µg/mL (NP3) que foram sonicadas durante 15 minutos antes da exposição. Todas as soluções de NPTiO₂ foram preparadas no dia da exposição. As concentrações de nanopartículas empregadas foram determinadas por meio da literatura (FEDERECI *et al.*, 2007; JOVANOVIĆ *et al.*, 2011;) e de experimentos prévios realizados no Laboratório de Citogenética Animal e Mutagênese Ambiental (DISNER *et al.*, 2017; KLINGELFUS *et al.*, 2018; VICARI *et al.*, 2018).

3.4 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO

A caracterização das suspensões de nanopartícula foi realizada pelo aparelho Zetasizer® (Malvern Instruments, Worcestershire, UK) no qual se verificou o tamanho médio das partículas, o índice de polidispersão e o potencial zeta das mesmas. Para análise de tamanho das partículas e índice de polidispersão utilizou-se cubeta de poliestireno. Com o auxílio da microscopia eletrônica de transmissão, obteve-se a morfologia dos agregados de nanopartículas.

3.5 EXPOSIÇÃO ÀS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NPTiO₂

O meio de cultura das células plaqueadas e incubadas *overnight* foi removido e os poços foram denominados da seguinte forma: CN (controle negativo), NP1, NP2, NP3, CP (controle positivo). Cada poço recebeu 2 mL da solução de NPTiO₂ nas suas respectivas concentrações. Para o controle negativo, foram adicionados somente 2 mL de meio L-15 ao poço. Para o controle positivo, o MMS foi exposto nas células na concentração de 0.5 mM. O período de exposição foi de 3 horas e, durante este processo, as células foram mantidas na temperatura de 20° C na incubadora BOD. Ao final dessa etapa, prosseguiu-se para a realização do ensaio cometa.

3.6 ENSAIO COMETA

A obtenção das suspensões celulares para o ensaio cometa foi realizada por meio de tripsinização. Após a dissociação enzimática, as amostras foram coletadas em microtubos do tipo Eppendorf® e centrifugadas por 5 minutos e 1500 rpm. Após a formação do *pellet*, foram deixados 100 µL de amostra, dos quais foram retirados 10 µL para realização do teste de viabilidade celular, por meio da adição do corante *Trypan blue*. Após a retirada, adicionou-se 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão

(LMP - 0,5%) ao *pellet*. Em seguida, as lâminas previamente recobertas com agarose normal, receberam a suspensão celular + LMP e foram cobertas com lamínulas e refrigeradas por 10 minutos. Em seguida, as lamínulas foram removidas e as lâminas foram imersas em solução de lise (10 mM Tris; 100 mM (EDTA), 2,5 M cloreto de sódio (NaCl); dimetilsulfóxido (DMSO) 10%, pH>10) na temperatura de 4°C durante 2 horas. Decorrido esse período, as lâminas foram retiradas da solução de lise e acondicionadas na cuba de eletroforese. As lâminas foram então submersas em tampão alcalino (300 mM (NaOH); 1 M EDTA; pH>13) por um intervalo de tempo de 25 minutos a 4°C e em seguida submetidas a eletroforese por mais 25 minutos (25 V-300 mA). Posteriormente, as lâminas foram retiradas e lavadas com tampão de neutralização (0,4 M Tris; pH 7,5) por 3 vezes, totalizando 15 minutos. Após a lavagem, as lâminas foram fixadas com etanol absoluto durante 5 minutos e estocadas a 4°C (LEME *et al.*, 2014).

Para a análise, as lâminas fixadas foram coradas com 25 µL de brometo de etídio para análise em microscópio de epifluorescência (aumento de 400 x - marca Leica® - modelo DFC 300) e os resultados analisados pelo programa: Metafer IV – Monochrome. Esta análise consiste em mensurar a porcentagem de DNA na “cauda” do cometa, em relação à quantidade de DNA presente na “cabeça” do mesmo, após a análise de 100 nucleóides por lâmina, após a verificação da intensidade do corante adicionado ao DNA (Figura 2). Após a quantificação desses dados, os mesmos foram expressos em média e desvio padrão da porcentagem de DNA na cauda (*Tail intensity*).

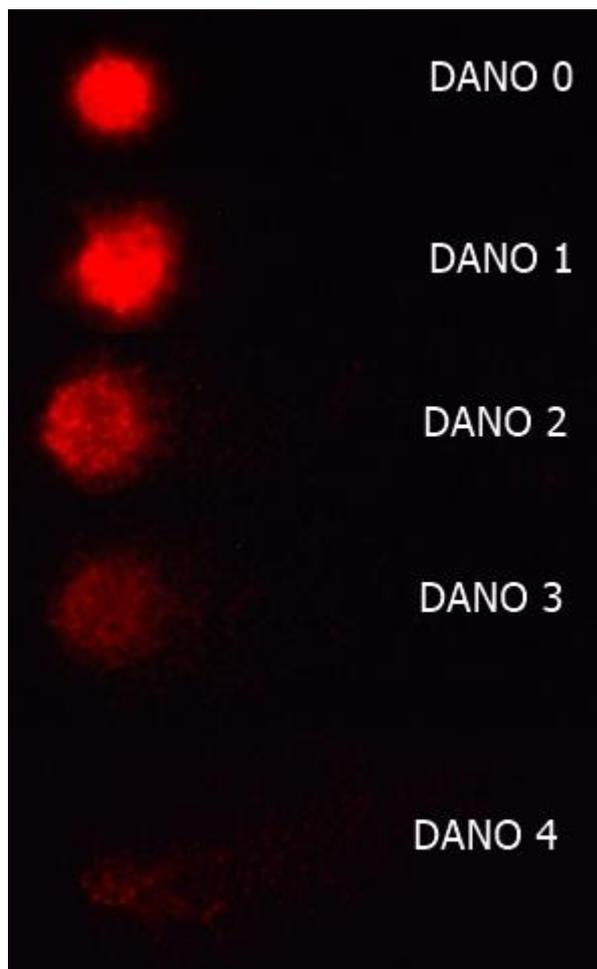


Figura 2: Nucleóides de RTgill-W1 após a realização do ensaio cometa. O valor de dano 0 indica a ausência de danos, ao passo que o dano 4 corresponde a presença de alta taxa de dano no DNA. Fonte: a autora.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A primeira análise estatística realizada foi a de normalidade por meio do teste de Shapiro-Wilk. Em seguida, aplicou-se o teste t não pareado com correção de Welch para dados paramétricos afim de se verificar a presença de diferença significativa dentro dos tratamentos. Foram considerados significativos apenas os tratamentos que apresentaram ($p < 0,05$) segundo testes estatísticos realizados por meio dos programas BioEstat 5 e Graph Pad Prism 6. Foi aplicada também a análise de *fold-change* entre os tratamentos afim de verificar a taxa de mudança entre os grupos. Para essa análise, o nível estatístico considerado foi de $0.5 > \text{Fold-change} > 2$ para aumento ou diminuição em relação ao respectivo controle (KLINGELFUS *et al.*, 2017).

4. RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO

As NPTiO₂ apresentam-se em forma de pó de coloração branca. Todas as concentrações testadas foram caracterizadas como instáveis pelo dados gerados pelo aparelho Zetasizer®, uma vez que o potencial zeta teve valores entre 30 mV < z < -30 mV e polidispersão acima de >20% (Tabela 1).

Tabela 1: Características avaliadas pelo aparelho zeta sizer®, das três suspensões coloidais de nanopartículas de dióxido de titânio nas concentrações de 0.1 µg/mL; 1 µg/mL e 10.0 µg/mL. Fonte: a autora.

Nanomaterial	Suspensão (µg/mL)	Potencial Zeta (mV)	Polidispersão (%)
NPTiO ₂	0.1	-1.03	66.60
	1	-7.82	93.86
	10	-6.70	93.86

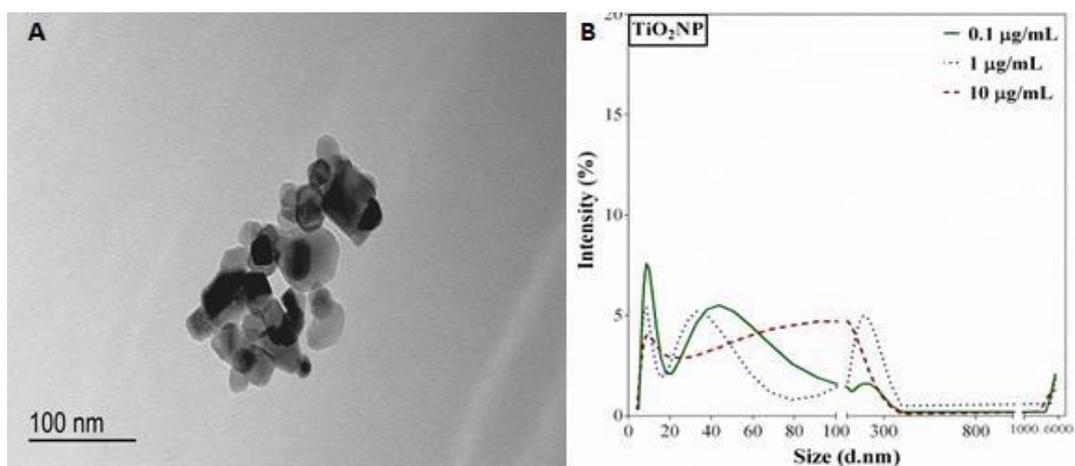


Figura 3: Caracterização da nanopartícula de dióxido de titânio. (A) Eletromicrografia de NPTiO₂ em escala de 100 nm. (B) Gráfico com informações sobre tamanho médio de NpTiO₂ em pó. Fonte: a autora.

4.2 CULTURA DE CÉLULAS DE BRÂNQUIA (RTgill-W1)

O cultivo celular rotineiro das células da RTgill-W1 foi bem sucedido. As células apresentaram morfologia fibroblástica normal (Figura 4) conforme descrito no protocolo disponibilizado pela ATCC.



Figura 4: Morfologia epitelial da linhagem RTgill-W1 na segunda passagem após descongelamento (aumento de 40x). Fonte: a autora.

4.3 ENSAIO COMETA DAS CÉLULAS RTgill-W1

Após a realização do ensaio cometa, foram analisados 100 nucleóides por lâmina no microscópio (aumento de 400 x - marca Leica® - modelo DFC 300). Após a aquisição de imagens pelo microscópio, as lâminas foram analisadas no software Metafer IV – Monochrome.

A comparação das médias de danos ao DNA entre os tratamentos e o controle negativo se mostrou significativa ($p < 0,0001$). Comparando-se par a par a média de cada tratamento com o CN, apenas a NP1 ($p = 0.018$) e a NP2 ($p = 0.0057$) foram significativas, enquanto NP3 teve valor de $p = 0.0772$. Embora não seja significativo, fica muito próximo do limite estatístico considerado, demonstrando tendência à ser considerada significativa (Figura 5). Nas comparações par a par entre os tratamentos de nanopartículas, apenas a comparação NP1XNP2 foi significativa

($p=0.0264$). Para comparar a taxa de mudança entre o controle negativo e os tratamentos, foi aplicado o teste de *fold-change*. Embora todos tenham apresentado um aumento significativo dentro do nível estatístico considerado ($0.5 > \textit{Fold-change} > 2$), a concentração NP2 foi a maior elevação de todas, sendo aproximadamente 13 vezes maior do que o controle negativo.

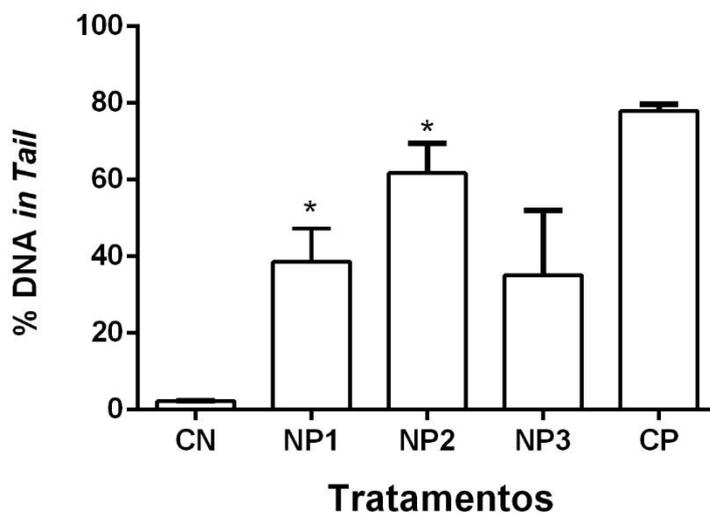


Figura 5: Comparação dos danos ao DNA entre todos os tratamentos (CN, NP1, NP2, NP3 e CP). Os asteriscos indicam as concentrações genotóxicas. Fonte: a autora.

5. DISCUSSÃO

O aumento da dispersão das nanopartículas de dióxido de titânio no ambiente torna cada vez mais importante a avaliação dos possíveis riscos inerentes a este xenobiótico aos organismos presentes no ecossistema aquático. Ao longo da última década, pesquisas acerca da toxicidade das NPTiO₂ foram realizadas com diversos grupos de vertebrados e invertebrados aquáticos (CLEMENTE *et al.*, 2012). Estudos *in vivo* conduzidos em peixes demonstraram que a exposição às NPTiO₂ pode causar alterações moleculares, bioquímicas, fisiológicas e histológicas em diferentes órgãos (CHEN *et al.*, 2011; JOVANOVIĆ *et al.*, 2011; LEE *et al.*, 2012; PURUSHOTHAMAN *et al.*, 2014; RAMSDEN *et al.*, 2009; VIGNARDI *et al.*, 2015).

Por ser o principal local de entrada e absorção de contaminantes presentes nos corpos hídricos, as brânquias são os primeiros órgãos a sofrerem alterações. De fato, carpas (*Cyprinus carpio*) (HAO *et al.*, 2009) e truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (FEDERICI *et al.*, 2007) registraram danos nas brânquias e altas taxas de ventilação quando expostas a soluções aquosas de NPTiO₂. Ainda no mesmo estudo, Federici *et al.*, (2007) observaram que a exposição hídrica também foi responsável por distúrbios ligados ao estresse oxidativo, caracterizado pelo aumento na concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbiúrico (TBARS) nas brânquias, no cérebro e no intestino de truta arco-íris. Em outro estudo realizado por Boyle e colaboradores (2012), a exposição hídrica à NPTiO₂ na concentração de 1 mg/L durante 14 dias resultou na diminuição do tempo de natação de trutas arco-íris, além de danos severos no epitélio branquial.

Entretanto, a toxicidade *in vitro* de NPTiO₂ utilizando-se células de peixe ainda não é muito difundida. Até o momento, a literatura científica compreende 10 estudos nos quais os mecanismos de toxicidade das nanopartículas de dióxido de titânio em células de peixe foram testados *in vitro* (REEVES *et al.*, 2008; THOMAS *et al.*, 2011; VEVERS e JHA, 2008; SEKAR *et al.*, 2014; BERMEJO-NOGALES *et al.*, 2017; DUBEY *et al.*, 2015; SRIKANTH *et al.*, 2015; LAMMEL e STURVE, 2018; ÖZGÜR *et al.*, 2018; KLINGELFUS *et al.*, 2018). O tipo de modelo *in vitro* empregado nesses estudos compreendem células primárias e linhagens celulares derivadas de diferentes órgãos e tecidos (gônada, brânquias, pele, fígado, sangue, barbatana e embrião) e diferentes

espécies de peixe (*Oncorhynchus mykiss*, *Carassius auratus*, *Lepomis macrochirus*, *Wallago attu*, *Oncorhynchus tshawytscha* e *Poeciliopsis lucida*), sendo que nenhum dos estudos desenvolvidos até o momento utilizaram uma espécie nativa brasileira como organismo-teste.

No presente estudo, dentre as três concentrações testadas, as que apresentaram genotóxicas quando comparadas ao controle negativo e aos demais tratamentos foram de 0.1 µg/mL (NP1) e 1.0 µg/mL (NP2). A partir desses resultados, pode-se supor, por exemplo, que a força iônica tenha influenciado a aglomeração das partículas e a consequente formação de agregados, sendo assim, quanto mais concentrada a solução, maior o tamanho dos agregados formados. Portanto, as menores doses, por formarem agregados menores, teriam mais facilidade de entrar nas células e no núcleo, favorecendo o dano ao DNA nos dois tratamentos (PATRI *et al.*, 2009). Nanopartículas com tamanho menor do que 120 nm podem entrar nas células por meio de diferentes processos de endocitose. Devido a heterogeneidade no tamanho das nanopartículas, o mecanismo de entrada de cada uma pode ser diferente. A internalização das nanopartículas para o núcleo também é possível devido a presença do poro nuclear em vertebrados, que apresenta um diâmetro de 80-120 nm (ZHU *et al.*, 2012). Embora o tamanho das NPTiO₂ apresentadas nesse estudo (Tabela 1 e Figura 2) sejam heterogêneas, uma quantidade considerável apresentou tamanho entre 100-120 nm, sendo este um possível mecanismo de dano ao DNA.

De fato, baixas concentrações de NPTiO₂ (0.1 mg/L, equivalente a 0.1 µg/mL) se mostraram tóxicas para células espermáticas de *Danio rerio* contaminadas via exposição hídrica durante 3 horas, demonstraram aumento significativo na atividade da enzima antioxidativa superóxido dismutase (SOD), relacionada com os mecanismos de estresse oxidativo (ÖZGÜR *et al.*, 2018). Ainda na mesma concentração, Jovanovic e colaboradores (2011), concluíram que as NPTiO₂ podem estimular o processo oxidativo de neutrófilos no sistema respiratório na espécie de peixe *Pimephales promelas*.

Apesar da maior concentração de nanopartículas não ter sido genotóxica (p=0.772), a análise de *fold-change* demonstrou que as células na concentração NP3 apresentaram porcentagem de dano na cauda do DNA cerca de 6 vezes maior do que

o observado no controle negativo. Embora a ausência de significância seja evidente, a sensibilidade de um sistema biológico pode ser afetada por uma mudança brusca causada na quantidade de algum composto (ADLER e ALON, 2018).

Em um estudo realizado por LAMMEL e STURVE (2018), a toxicidade das nanopartículas de dióxido de titânio foi testada nas concentrações de 0.39, 0.78, 1.56, 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50 e 100 µg/mL em duas linhagens celulares diferentes, RTgill-W1 e RTL-W1, usando os ensaios de fluorescência *alamar blue* e CFDA-AM. Em ambos os ensaios, a intensidade da fluorescência começou a diminuir a partir da concentração de 12.5 µg/mL e as primeiras diferenças significativas foram registradas na marca de 50 µg/mL. Embora a diminuição da fluorescência tenha sido sutil, esse fenômeno está diretamente relacionado com a redução da viabilidade celular, indicando assim possíveis danos às linhagens celulares.

KLINGELFUS *et al.*, (2018), verificaram danos ao DNA na versão alcalina do ensaio cometa para as células da linhagem RTG-2 expostas as NPTiO₂ na concentração de 10 µg/mL, no entanto, nenhum resultado significativo foi encontrado nos outros tratamentos testados (0.1 µg/mL e 1.0 µg/mL) nesta versão do ensaio cometa. Por meio de modificações no protocolo alcalino do ensaio cometa (PFUHLER e WOLF, 1996; MERK e SPEIT, 1999) para a identificação de danos do tipo DNA-DNA e DNA-proteína todas as concentrações empregadas mostraram-se genotóxicas, sendo o mecanismo de *crosslink* das NPTiO₂ possivelmente o responsável pelos danos diretos à molécula de DNA verificados por este estudo.

Apesar de as concentrações menores terem sido mais genotóxicas a linhagem celular RTgill-W1, cabe aqui ressaltar que as concentrações empregadas neste estudo são extremamente aproximadas as reais quantidades de NPTiO₂ estimadas em amostras ambientais, sendo a concentração de 0.025 µg/mL representativa em águas residuais nos Estados Unidos (MUELLER e NOWACK, 2008; PÉREZ *et al.*, 2009) e 0.016 µg/mL representativa para amostras de efluentes industriais na Suíça (KAEGI, 2008). Ainda é importante enfatizar que o ecossistema aquático é o destino final de diversos compostos químicos, sendo assim, dificilmente uma substância se encontrará sozinha na natureza. Muitos estudos relatam a interação das NPTiO₂ com metais e pesticidas, por exemplo (HANDY *et al.*, 2008; BANAEI *et al.* 2011; FANG *et al.*, 2015;

DISNER *et al.*, 2017; VICARI *et al.*, 2018). Essa interação entre diferentes compostos reflete de modo realístico as situações que ocorrem na natureza, na qual nanopartículas podem facilmente interagir com outros compostos químicos resultantes de processos antropogênicos e resultar em efeitos prejudiciais aos organismos expostos.

A falta de conhecimento acerca dos mecanismos toxicológicos e genotóxicos por trás do emprego das nanopartículas de dióxido de titânio é de grande preocupação, uma vez que o despejo desses compostos no ambiente torna-se cada vez mais provável sua entrada no ambiente aquático. Foi possível demonstrar nesse estudo que os métodos alternativos, com especial atenção a utilização de linhagens celulares – aqui, a RTgill-W1 -, podem ser uma alternativa ao uso de ensaios *in vivo* na pesquisa, seguindo assim o conceito de redução proposto pela ideia dos 3R's na experimentação animal. No entanto, não se pode deixar de alertar a falta de literatura científica acerca do tema, principalmente quando voltada aos danos causados aos organismos aquáticos. Assim, torna-se necessário o incentivo de novos estudos para padronização de novas metodologias que permitam a criação e o aperfeiçoamento da legislação vigente que controlem o uso e o despejo de contaminantes emergentes no ambiente.

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho, foi possível evidenciar que as nanopartículas de dióxido de titânio em baixas concentrações são capazes de causarem danos ao DNA nas células da linhagem celular RTgill-W1. Ainda, o modelo *in vitro* empregado se mostrou eficiente para avaliação genotóxica, uma vez que foi sensível o suficiente para responder a todas as concentrações empregadas durante a exposição realizada neste estudo. Desse modo, torna-se cada vez mais necessária a realização de novos estudos que possam complementar os resultados presentes na literatura e bem como os apresentados nesse trabalho, uma vez que a produção e o uso das nanopartículas de dióxido de titânio na indústria vêm crescendo cada vez.

7. REFERÊNCIAS

ADLER, M. ALON, U. Fold-change detection in biological systems. **Current Opinion in Systems Biology**, v. 8, p. 81-89, 2018.

American Type Culture Collection. Disponível em: <https://www.atcc.org/Products/All/CRL-2523.aspx>. Acesso em: 11/11/2018.

Associação Brasileira de Química. Disponível em: <http://www.abq.org.br/rqi/Edicao-738.html>. Acesso em: 04/10/2018.

AUTHMAN, M.M.N.; ZAKI, M.S.; KHALLAF, E.A.; ABBAS, H.H. Use of fish as bio-indicator of the effects of heavy metal pollution. **Journal of Aquaculture Research and Development**, v. 6, n. 328, p. 4-13, 2015.

BANAEI, M.; SUREDA, A.; MIRYAGHEFI, A.; AHMADI, K. Effects of diazinon on biochemical parameters of blood in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 99, p. 1-6, 2011.

BERMEJO-NOGALES, A.; CONNOLLY, M.; ROSENKRANZ, P.; FERNANDEZ-CRUZ, M.L.; NAVAS, J.M.; Negligible cytotoxicity induced by different titanium dioxide nanoparticles in fish cell lines. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 138, p. 309–319, 2017.

BOLS, N. C.; LEE, L. E. J. Cell lines: availability, propagation and isolation. **Analytical Techniques**. Amsterdam. **Elsevier Science**, v. 3, p. 145–159; 1994.

BOLS, N.C.; DAYEH, V. R.; LEE, L. E. J.; SCHIRMER, K. Use of fish cell lines in the toxicology and ecotoxicology of fish. In: Moon, T.W.; Mommsen, T. P. (eds) *Bioche. Molec. Biol. Fishes*. Vol. 6: Environmental Toxicology. Amsterdam. **Elsevier Science**, v. 6, p. 43–84; 2005.

BOMBAIL, V.; AW, D.; GORDON, E.; BATTY, J. Application of the comet and micronucleus assays to butterfish (*Pholis gunnellus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland. **Chemosphere**, v.44, p.383-392, 2001.

BORAN, H.; BOYLE, D.; ALTINOK, I.; PATSIOUR, D.; HENRY, B. T. Aqueous Hg²⁺ associates with TiO₂ nanoparticles according to particle size, changes particle agglomeration, and becomes less bioavailable to zebrafish. **Aquatic Toxicology**, v.174, p. 242-246, 2016.

BraCVAM. CENTRO BRASILEIRO PARA VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ALTERNATIVOS. Disponível em: <https://www.incqs.fiocruz.br>. Acesso: 01/11/2018.

CANESI, L.; CIACCI, C.; BALBI, T. Interactive effects of nanoparticles with other contaminants in aquatic organisms: Friend or foe? **Marine Environmental Research**, v. 111, p.128-134, 2015.

CASTAÑO, A.; BOLS, N.; BRAUNBECK, T.; DIERICKX, P.; HALDER, M.; ISOMAA, B.; KAWAHARA, K.; LEE, L.E.J.; MOTHERSILL, C.; PÄRT, P.; REPETTO, G.; SINTES, J.R.; RUFLI, H.; SMITH, R.; WOOD, C.; SEGNER, H. The use of fish cell lines in ecotoxicology. **ATLA**, v. 31, p. 317–351, 2003.

Chemical Abstract Service - <https://www.cas.org/support/documentation/chemical-substances>. Acesso em: 5/07/2018.

CHEN, D.; ZHANG, D.; YU, J.C.; CHAN, K.M. Effects of Cu₂O nanoparticle and CuCl₂ on zebrafish larvae and a liver cell-line. *Aquatic Toxicology*, v. 105, p.344-354, 2011.

CLEMENTE Z.; CASTRO, V.L.; JONSONN, C.M.; FRACETO, L.F. Ecotoxicology of nano-TiO₂ — an evaluation of its toxicity to organism of aquatic ecosystems. **International Journal of Environmental Research**, v.6 (1), p. 33–50, 2012.

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Disponível em: <https://www.mctic.gov.br/mctic/opencms/institucional/concea/index.html>. Acesso em: 15/11/2018.

COLLINS A. R.; DOBSON V. L.; DUSINSKA M.; KENNEDY G.; STETINA R. The comet assay: what can it really tell us? **Mutation Research**, v. 376, p.183–193,1997.

COSTA, C.R.; OLIVI, P.; BOTTA, C.M.R.; ESPINDOLA, E.L.G. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 31 (7): 1820-1830, 2008.

DAYEH, V.R.; BOLS, N.C.; SCHIRMER, K.; LEE, L.E. The use of fish-derived cell lines for investigation of environmental contaminants. **Currents Protocols in Toxicology**, chapter 1, unit 1-5, 2003.

DISNER, G.R.; GUILOSKI, I.C. ; **KLINGELFUS, T.** ; OYA SILVA, L.F. ; LIROLA, J.R. ; SILVA DE ASSIS, H.C. ; CESTARI, M.M. . Co-exposure effects of Titanium Dioxide Nanoparticles and Metals on antioxidant systems and DNA in the fish *Hoplias intermedius*. **Ecotoxicology and Environmental Contamination**, v. 12, p. 75-84, 2017.

DUBEY, A.; GOSWAMI, M.; YADAV, K.; CHAUDHARY, D. Oxidative stress and nanotoxicity Induced by TiO₂ and ZnO on WAG Cell Line. **Plos One**, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127493>

EPA – *Environmental Protection Agency*. Disponível em: <https://www.epa.gov/chemical-research/research-nanomaterials>. Acesso em: 28/01/2018.

FANG, Q.; SHI, X.; ZHANG, L.; WANG, Q.; GUO, Y.; ZHOU, B. Effect of titanium dioxide nanoparticles on the bioavailability, metabolism, and toxicity of pentachlorophenol in zebrafish larvae. **Journal of Hazardous Materials**, v. 283, p.897-904, 2015.

FANG, Q.; SHI, X.; ZHANG, L.; WANG, Q.; GUO, Y.; ZHOU, B. Effect of titanium dioxide nanoparticles on the bioavailability, metabolism, and toxicity of pentachlorophenol in zebrafish larvae. **Journal of Hazardous Materials**, v. 283, p.897-904, 2015.

FEDERICI, G.; SHAW, B.J.; HANDY, R.D. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress and other physiological effects. **Aquatic Toxicology**, v.84, p.415-430, 2007.

FERRARO, M V M; FENOCCHIO, A S; MANTOVANI, M S; OLIVEIRA RIBEIRO, C; CESTARI, M M. Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (Pb II) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberration tests. **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, n. 1, p. 103-107, 2004.

FUJISHIMA, A.; RAO, T.N.; TRYK, D.A. Titanium dioxide photocatalysis. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, v.1, p. 1-21, 2000.
GEISSEN, V.; MOL, H.; KLUMPP, E.; UMLAUF, G.; NADAL, M.; VAN DER PLOEG, M.; VAN DE ZEE, S.E.A.T.M.; RITSEMA, C.J. Emerging pollutants in the environment: A challenge for water resource management. **International Soil and Water Conservation Research**, v. 3 (1), p. 57-65, 2015.

GOULART, M.; CALLISTO, M. Bioindicadores de qualidade de água como ferramenta em estudos de impacto ambiental. **Revista da FAPAM**. Ano 2, n. 1, 2003. Disponível em:<http://apostilas.cena.usp.br/Valdemar/CEN0413%20%20Agrot%C3%B3xicos%20%20Intera%C3%A7%C3%B5es%20no%20Ambiente/bioindicadores%2019.10.2010.pdf>. Acesso em: 13/11/2018.

GURR , J.R.; WANG, A.S.; CHEN, C.H.; JAN, K.Y. Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. **Toxicology**, v. 213(1-2), p.66-73, 2005.

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

HAO, L.; WANG, Z.; XING, B. Effect of sub-acute exposure to TiO₂ nanoparticles on oxidative stress and histopathological changes in juvenile carp (*Cyprinus carpio*). **Journal of Environmental Sciences**, v.21, p.1459-1466, 2009.

HAYNES, V.N.; BRANDON, E.W.; RUSSEL, J. AGRIOS, G. A. Photocatalytic effects of titanium dioxide nanoparticles on aquatic organisms — Current knowledge and suggestions for future research. **Aquatic Toxicology**, v. 185, p. 138-148, 2017.

HAYNES, V.N.; BRANDON, E.W.; RUSSEL, J. AGRIOS, G. A. Photocatalytic effects of titanium dioxide nanoparticles on aquatic organisms — Current knowledge and suggestions for future research. **Aquatic Toxicology**, v. 185, p. 138-148, 2017.

HOUTMAN, C. J. Emerging contaminants in surface waters and their relevance for the production of drinking water in Europe. **Journal of Integrative Environmental Sciences**, 7:4, 271-295, 2010.

HU, Q.; ZHAO, F.; GUO, F.; FU, Z. Effects of titanium dioxide nanoparticles exposure on parkinsonism in zebrafish larvae and PC12. **Chemosphere**, v. 173, p. 373-379, 2017. induced by TiO₂ and ZnO on WAG cell line. **PLoS One**, v. 10, p. 127-138, 2015.

JOVANOVIĆ, B.; ANASTASOVA, L.; ROWE, E.W.; ZHANG, Y.J.; CLAPP, A.R.; PALIC, D. Effects of nanosized titanium dioxide on innate immune system of fathead minnow (*Pimephales promelas Rafinesque, 1820*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, p. 675–683, 2011.

JOVANOVIĆ, B.; WHITLEY, E.M.; KIMURA, K.; CRUMPTON, A.; PALIC, D. Titanium dioxide nanoparticles enhance mortality of fish exposed to bacterial pathogens. **Environmental Pollution**, v. 203, p. 153-164, 2015.

KAEGI, A.; ULRICH, B.; SINNET, R.; VONBANK, A.; WICHSER, S.; ZULEEG, H.; SIMMLER, S.; BRUNNER, H.; VONMONT, M.; BURKHARDT, M. Synthetic TiO₂ nanoparticle emission from exterior facades into the aquatic environment. **Environmental Pollution**, v. 156 (2), p. 233-239, 2008.

KHAN, I.; SAEED, K.; KHAN, I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. **Arabian Journal of Chemistry**, 2017.

KLINGELFUS, T.; DISNER, G.R.; VOIGT, C.L.; ALLE, L.F.; CESTARI, M.M.; LEME, D.M. Nanomaterials induce DNA-protein crosslink and DNA oxidation: a mechanistic study with RTG-2 fish cell line and Comet assay modifications. **Chemosphere**, v. 215, p. 703-709, 2018.

KLINGELFUS, T.; LIROLA, J.R.; OYA SILVA, L.F.; DISNER, G.R.; VICENTINI, M.; NADALINE, M.J.B.; ROBLES, J.C.Z.; TREIN, L.M.; VOIGT, C.L.; SILVA DE ASSIS, H.C.; MELAC, M.; LEMES, D.M.; CESTARI, M.M. Acute and long-term effects of trophic exposure to silver nanospheres in the central nervous system of a neotropical fish *Hoplias intermedius*. **Neurotoxicology**, v. 63, p. 146-154, 2017.

LAMMEL, T.; STURVE, J. Assessment of titanium dioxide nanoparticle toxicity in the rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*) liver and gill cell lines RTL-W1 and RTgill-W1 under particular consideration of nanoparticle stability and interference with fluorometric assays. **NanoImpact**, v. 11, p. 1-9, 2018.

LEE, B.C.; KIM, K.T.; CHO, J.G.; LEE, J.W.; RYU, T.K.; YOON, J.H.; LEE, S.H.; DUONG, C.N.; EOM, I.C.; KIM, P.J.; CHOI, K.H. Oxidative stress in juvenile common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to TiO₂ nanoparticles. **Molecular and Cellular Toxicology**, v. 8, p. 357–366, 2012.

LEE, K.J.; P.D. NALLATHAMBY, L.M. BROWNING, C.J. OSGOOD, X.H. XU. In vivo imaging of transport and biocompatibility of single silver nanoparticles in early development of zebrafish embryos. **ACS Nano**, v. 1, p. 133–143, 2007.

LEME, D. M.; DE OLIVEIRA, G. A.; MEIRELES, G.; DOS SANTOS, T. C.; ZANONI, M. V.; DE OLIVEIRA, D. P. Genotoxicological assessment of two reactive dyes extracted from cotton fibres using artificial sweat. **Toxicology in vitro**, v.28, p.31–38, 2014.

LI, L.; FERNANDEZ-CRUZ, M.L.; CONNOLLY, M.; CONDE, E.; FERNÁNDEZ, M.; SCHUSTER, M.; NAVAS, J.M. The potentiation effect makes the difference: non-toxic concentrations of ZnO nanoparticles enhance Cu nanoparticle toxicity in vitro al. **Science**

of the **Total Environment**, v. 505, p. 253–260, 2015.

MANSOURI, A.; FATHI, M.; MANSOURI, B.; AZADI, A.N. Coexisting of titanium dioxide nanoparticles and diazinon on histopathology of common carp (*Cyprinus carpio*). **Comparative Clinical Pathology**, v. 25, p. 1227-1236, 2016 a.

MENARD, A.; DROBNE, D.; JEMEC, A. Ecotoxicity of nanosized TiO₂. Review of in vivo data. **Environmental Pollution**, v. 159, n. 3, p. 677-684, 2011.

MERK, O., SPEIT, G. Detection of crosslinks with the comet assay in relationship to genotoxicity and cytotoxicity. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 33, p. 167-172, 1999.

MILLS, A.; LEE, S. K.; A web-based overview of semiconductor photochemistry-based current commercial applications. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 152, p. 233–247, 2002.

MIRANDA, R.R.; SILVEIRA, A.L.R.D.; JESUS, I.P.; GROTZNER, S.R.; VOIGT, C.L.; CAMPOS, X.S.; GARCIA, J.R.E.; RANDI, M.A.F.; RIBEIRO, C.A.O.; NETO, F.F. Effects of realistic concentrations of TiO₂ and ZnO nanoparticles in *Prochilodus lineatus* juvenile fish. **Environmental Science Pollution Research**, v. 23, p. 5179-5188, 2016.

MUELLER, N.C.; NOWACK, B. Exposure modeling of engineered nanoparticles in the environment. **Environmental Science and Technology**, v.42, p. 4447–4453, 2008.

OBERDORSTER, G., MAYNARD, A., DONALDSON, K. Principles for Characterizing the Potential Human Health Effects from Exposure to Nanomaterials: Elements of a Screening Strategy. *Particle Fibre*. **Toxicology**, v. 2, p. 1–8, 2005.

OLIVE, P. L.; BANÁTH, J. P.; DURAND, R. E. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the “comet” assay. **Radiation Research**, v. 122, p. 86 – 94, 1990.

ÖZGÜR, E. M.; BALCIOGLU, S.; ULU, A.; OZCAN, I.; OKUMU, F.; KOYTEPE, S.; ATES, B. The in vitro toxicity analysis of titanium dioxide nanoparticles (TiO₂) on kinematics and biochemical quality of rainbow trout sperm cells. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 62, p. 11-19, 2018.

PATRI, A.; UMBREIT, T.; ZHENG, J.; NAGASHIMA, K.; GOERING, P.; FRANCKECARROLL, S.; GORDON, E.; WEAVER, J.; T. MILLER, T.; N. SADRIEH, N. Energy dispersive X-ray analysis of titanium dioxide nanoparticle distribution after intravenous and subcutaneous injection in mice. **Journal of Applied Toxicology**, v.29, p. 662–672, 2009.

PÉREZ, S.; FARRÉ, M.L.; BARCELÓ, D. Analysis, behavior and ecotoxicity of carbon-based nanomaterials in the aquatic environment. **Chemosphere**, v. 28, p. 820–832, 2009.

PETRIE, B.; BARDEN, R.; KASPRZYK-HORDERN, B. A review on emerging contaminants

in wastewaters and the environment: Current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring. **Water Research**, v. 72, p. 3-27, 2015.

PFUHLER, S., WOLF, H.U. Detection of DNA-crosslinking agents with the alkaline comet assay. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 27, 196-201, 1996.

PURUSHOTHAMAN, S.; RAGHUNATH, A.; DHAKSHINAMOORTHY, V.; PANNEERSELVAM, L.; PERUMAL, E. Acute exposure to titanium dioxide (TiO₂) induces oxidative stress in zebrafish gill tissues. **Toxicology and Environmental Chemistry**, v. 96, p. 890–905, 2014.

RAMSDEN, C.S.; SMITH, T.J.; SHAW, B.J.; HANDY, R.D. Dietary exposure to titanium dioxide nanoparticles in rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*): no effect on growth, but subtle biochemical disturbances in the brain. **Ecotoxicology**, v. 18, p. 939–951, 2009.

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, 113–122, 2008.

RENAMA – Rede Nacional de Métodos Alternativos. Disponível em: <https://www.mctic.gov.br/mctic/opencms/ciencia/SEPED/Saude/renama/renama.html>. Acesso em: 09/11/2018.

SCHIRMER, K.; CHAN, A.G.J.; GREENBERG, B.M.; DIXON, D.G.; BOLS, N.C. Methodology for demonstrating and measuring the photocytotoxicity of fluoranthene to fish cells in culture. **Toxicology in Vitro**, v. 11, p.107-113, 1997.

SCHNELL, S.; STOTT, L.C.; HOGSTRAND, C.; WOOD, C.M.; KELLY, S.P.; PÄRT, P.; OWEN, S.; BURY, N.R. Procedures for the reconstruction, primary culture and experimental use of rainbow trout gill epithelia. **Nature Protocols**, v. 11, p. 490-498, 2016.

SEKAR, D.; FALCIONI, M.L.; BARUCCA, G.; FALCIONI, G. DNA damage and repair following *in vitro* exposure to two different forms of titanium dioxide nanoparticles on trout erythrocyte. **Environmental Toxicology**, v. 29, p. 117–127, 2014.

SHARMA, V.K. Aggregation and toxicity of titanium dioxide nanoparticles in aquatic environment – a review. **Journal of Environment Science and Health**, v. 44, p. 1485-1495, 2009.

SILVA, J. M.; SANTOS, J.R. Toxicologia de agrotóxicos em ambientes aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**. v. 11 (4): 565-573, 2007.

SRIKANTH, K.; PEREIRA, E.; DUARTE, A.C.; AHMAD, I.; RAO, J.V. Assessment of cytotoxicity and oxidative stress induced by titanium oxide nanoparticles on Chinook salmon cells. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, p. 15579–15586, 2015.

TANNEBERGER, K.; KNÖBEL, M.; BUSSE, F.J.; SINNIGE, T.L.; HERMENS, J.L.;

SCHIRMER, K. Predicting fish acute toxicity using a fish gill cell line-based toxicity assay. **Environmental Science and Technology**, v. 47, p. 1110–1119, 2013.

TECHNICAL FACT SHEET – NANOMATERIALS, EPA 2017. Disponível: https://www.epa.gov/sites/production/files/201403/documents/ffrrofactsheet_emergingcontaminant_nanomaterials_jan2014_final.pdf. Acesso em: 29/10/2018.

THOMAS, K.V.; FARKAS, J.; FARMEN, E.; CHRISTIAN, P.; LANGFORD, K.; WU, Q.; TOLLEFSEN, K.E. Effects of dispersed aggregates of carbon and titanium dioxide engineered nanoparticles on rainbow trout hepatocytes. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 74, p. 466–477, 2011.

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 (2), p. 57-149, 2003.

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

VICARI, T.; DAGOSTIM, A.C.; KLINGELFUS, T.; GALVAN, G.L.; MONTEIRO, P.S.; PEREIRA, L.S.; ASSIS, H.C.S.; CESTARI, M.M. Co-exposure to titanium dioxide nanoparticles (NpTiO₂) and lead at environmentally relevant concentrations in the Neotropical fish species *Hoplias intermedius*. **Toxicology Reports**, v. 5, p. 1032-1043, 2018.

VIGNARDI, C.P.; HASUE, F.M.; SARTORIO, P.V.; CARDOSO, C.M.; MACHADO, A.S.D.; PASSOS, M.; SANTOS, T.C.A.; NUCCI, J.M.; HEWER, T.L.R.; WATANABE, I.S.; GOMES, V.; PHAN, N.V. Genotoxicity, potential cytotoxicity and cell uptake of titanium dioxide nanoparticles in the marine fish *Trachinotus carolinus* (Linnaeus, 1766). **Aquatic Toxicology**, v. 158, p. 218–229, 2015.

White Book on Nanotechnologies. Studies in Nanoparticles, Nanostructures, and Nanocomposites in the Russian Federation, in Mater. Pervogo vsereos. soveshch. uchenykh, inzhenerov i proizvoditelei v oblasti nanotekhnologii (**Proc. First All Russia 104 Congress of Scientists, Engineers, and Manufacturers in Nanotechnology**), Moscow: LKI, p. 344, 2008.

JWOOD, C.M.; KELLY, S.P.; ZHOU, B.; FLETCHER, M.; O'DONNELL, M.; ELETTI, B.; PÄRT, P. Cultured gill epithelia as models for the freshwater fish gill. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1566, p. 72-83, 2002.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações. 2ª edição, **Editores Rima**, p. 464, 2006.

ZHANG, W.; CRITTENDEN, J.; LI, K.G.; CHEN, Y.S. Attachment efficiency of nanoparticle aggregation in aqueous dispersions: modeling and experimental validation. **Environmental Science and Technology**, v. 46 (13), p. 7054-7060, 2012.

ZHU, M., NIE, G., MENG, H., XIA, T., NEL, A., ZHAO, Y. Physicochemical properties

determine nanomaterial cellular uptake, transport, and fate. *Accounts Chemistry Research*, v. 46, p. 622-631, 2012