**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

TIAGO ALVES JORGE DE SOUZA

**Efeito do tamanho das nanopartículas de prata na indução de
danos citotóxicos e genotóxicos nas linhagens celulares CHO-K1 e
CHO-XRS5**

**Ribeirão Preto
2013**

TIAGO ALVES JORGE DE SOUZA

**Efeito do tamanho das nanopartículas de prata na indução de danos
citotóxicos e genotóxicos nas linhagens celulares CHO-K1 e CHO-XRS5**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção de título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Genética

Orientadora:
Prof^ª. Dra. Catarina Satie Takahashi

Ribeirão Preto
2013

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica

Souza, Tiago Alves Jorge de

Efeito do tamanho das nanopartículas de prata na indução de danos citotóxicos e genotóxicos nas linhagens celulares CHO-K1 e CHO-XRS5. Ribeirão Preto, 2013.

78 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Genética. Orientador: Satie Takahashi, Catarina.

1. Citotoxicidade. 2. Genotoxicidade. 3. Nanopartículas de prata. 4. Teste do Micronúcleo. 5. Ensaio Cometa.

Apoio e Suporte Financeiro

Este trabalho foi realizado com o apoio das seguintes entidades e instituições:
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES

Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FAEPA-HC/FMRP-USP)

Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Imagem: modificada de: <<http://www.animalport.com/animal-cells.html>>. Acesso em: 8 de maio. 2013

Nome: SOUZA, Tiago Alves Jorge de

Título: Efeito do tamanho das nanopartículas de prata na indução de danos citotóxicos e genotóxicos nas linhagens celulares CHO-K1 e CHO-XRS5

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção de título de Mestre em Ciências

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

À **Profa Dra Catarina Satie Takahashi** pela orientação deste trabalho e também por ter proporcionado as condições para o desenvolvimento da pesquisa. Agradeço também por todo o conhecimento fornecido, pelos conselhos, pela simpatia e disponibilidade demonstradas durante a realização deste trabalho.

À **Profa Dra Elza Tiemi** pelo e apoio e companheirismo e por incentivar o intercâmbio intelectual com pesquisadores estrangeiros.

Ao **Prof. Dr. Ademilson Espencer** (Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Genética) pela simpatia e apoio durante o mestrado.

Às Secretárias do Departamento de Genética, **Susie e Sílvia**, por me atenderem sempre de forma sorridente e pela paciência em esclarecer todas as minhas dúvidas.

Aos **professores** membros da banca examinadora, pela disponibilidade em analisar este trabalho e pelas sugestões e críticas.

Ao técnico **Luís Augusto da Costa Junior** pelos ensinamentos, broncas, conselhos, risadas e acima de tudo, pela amizade.

À técnica **Sueli Aparecida Neves** pelos momentos de descontração e pelo carinho e amizade.

Às faxineiras **Vera e Cleuza** por proporcionarem um ambiente limpo e organizado para a realização das atividades no laboratório.

À todos os amigos e colegas de Laboratório de Citogenética e Mutagênese Ambiental:

Leonardo (leopardo, nanoleo, etc) pela imensa paciência que teve comigo, por me socorrer sempre quando precisei, por me guiar na elaboração deste trabalho e por ter se tornado um grande amigo.

Fernanda Caetano pela ajuda indispensável na revisão deste trabalho e pelos momentos de descontração, companheirismo e pelo exemplo de seriedade profissional.

Verônica, que apesar de ter chegado ao laboratório há pouco tempo já conquistou o carinho e respeito de todos como também a minha amizade.

Ana Paula, pela ajuda na revisão deste trabalho, pelas caronas e pela atenção, paciência e amizade.

Giovana, por me fazer companhia nas limpezas no laboratório, pelo carinho e pelas conversas teológicas e filosóficas.

Fernanda Carvalho, por transmitir tranquilidade em meio à agitada rotina do laboratório, por meio de sua célebre expressão: “De boa”.

Flavinha, que deixou saudades pelos momentos de diversão, pelas piadinhas e trocadilhos.

Danilo, pelas risadas e apelidos criativos.

Paulo, pelos conselhos e por me socorrer em situações desesperadoras.

Paulinha, pela ajuda na correção deste trabalho, pelas conversas e pelos momentos de descontração.

William, pelas brincadeiras e por me ensinar canções em espanhol.

Andrés, por sempre estar disposto a ajudar e compartilhar o seu conhecimento e experiência.

João Paulo, pelas conversas, por alegrar o ambiente de trabalho do laboratório e por arrumar uma república para eu morar.

À minha namorada **Nara** pela paciência e compreensão durante os fins de semana que tive que ficar em Ribeirão Preto e pelo apoio e amor em todos os momentos. Eu te amo!

Á minha linda família (**Noemi** (mãe), **Nahor** (pai), **Israel** (irmão), **Ana Cláudia e Sarah** (irmãs) pelo apoio emocional, espiritual e financeiro em todos os momentos. Sem a ajuda de vocês eu não conseguiria completar mais essa fase da minha vida. Amo todos vocês!

Ao meu pai **Nahor** e ao meu irmão **Israel** por me ajudarem na estruturação e na revisão gramatical deste trabalho.

Á **Deus** por me dar forças e condições para realizar este trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	I
ABSTRACT	I
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Nanotecnologia e nanopartículas: relevância e aplicações	1
1.2. Nanopartículas de prata	3
1.3. Genotoxicidade e citotoxicidade das nanopartículas	6
1.4. Utilização das linhagens CHO para avaliação de citotoxicidade e genotoxicidade	10
2. OBJETIVOS	13
2.1. Objetivo Geral	13
2.2. Objetivos Específicos	13
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1. Nanopartículas de prata (AgNPs)	14
3.2. Linhagens Celulares	15
3.3. Cultivo Celular	15
3.4. Controles Experimentais.....	15
3.4.1. Doxorrubicina	15
3.4.2. Metil Metano Sulfonato	16
3.4.3. Controle negativo	17
3.5. Dispersão Dinâmica de Luz.....	17
3.6. Ensaio para a avaliação da citotoxicidade das nanopartículas de prata (AgNPs)	18
3.6.1. Ensaio de Viabilidade Celular (XTT)	18
3.6.2. Ensaio Clonogênico	19
3.7. Ensaio para a avaliação da genotoxicidade das nanopartículas de prata (AgNPs)	19
3.7.1. Ensaio Cometa	19
3.7.2. Teste do micronúcleo	22
3.7.3. Cinética do Ciclo Celular por Citometria de Fluxo	24
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	26
5. RESULTADOS.....	27
5.1. Dispersão Dinâmica de Luz.....	27
5.2. Ensaio de Viabilidade Celular (XTT).....	29
5.3. Sobrevivência Clonogênica	31

5.4. Ensaio Cometa.....	33
5.5. Teste do Micronúcleo	35
5.5.1. Índice de Divisão Nuclear.....	35
5.5.2. Frequência de Células Binucleadas Micronucleadas	36
5.5.3. Frequência de Células Binucleadas com Pontes Nucleoplasmáticas.....	37
5.6. Ciclo Celular.....	39
5.6.1. Linhagem CHO-K1.....	39
5.6.2. Linhagem CHO-XRS5.....	39
6. DISCUSSÃO.....	54
6.1. Citotoxicidade das AgNPs.....	54
6.2. Genotoxicidade das AgNPs	57
7. CONCLUSÕES	64
REFERÊNCIAS	65

RESUMO

SOUZA, T. A. J. **Efeito do tamanho das nanopartículas de prata na indução de danos citotóxicos e genotóxicos nas linhagens celulares CHO-K1 e CHO-XRS5**, 2013. 78 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Devido às características especiais as nanopartículas (10^{-9} m) estão sendo utilizadas em uma ampla gama de produtos, porém é conhecido que a utilização dessas partículas podem causar efeitos biológicos adversos, aumentando a preocupação em relação à saúde e ao meio ambiente. Recentemente, as nanopartículas de prata (AgNPs) têm sido alvo de estudos genotóxicos e citotóxicos, sendo que ainda não existe um consenso acerca da relação entre tamanho e toxicidade dessas partículas. Assim, este trabalho avaliou a citotoxicidade e a genotoxicidade das AgNPs de 10 e 100 nm nas linhagens celulares CHO-K1 e CHO-XRS5, por meio dos Ensaios de Viabilidade Celular, Sobrevivência Clonogênica, Teste do Micronúcleo, o Ensaio Cometa e Cinética do Ciclo Celular por Citometria de Fluxo. Em todos os ensaios, as células foram expostas por 24 h às diferentes concentrações de AgNPs (0,025 a 5,0 μ g/ml) e, as células não tratadas foram utilizadas como controle negativo. A concentração de 5,0 μ g/ml foi citotóxica nos ensaios de Viabilidade Celular e Sobrevivência Clonogênica, sendo excluída dos ensaios de genotoxicidade. De maneira geral, as células CHO-XRS5 apresentaram menor viabilidade e maior quantidade de danos no DNA do que as células CHO-K1. As AgNPs de 10 nm causaram maiores níveis de danos no DNA em ambas as linhagens e um aumento de células em subG1 logo após o tratamento na linhagem CHO-K1. Entretanto, no tempo 24 e 72 h após o tratamento foi verificada a maior toxicidade (células em subG1) das AgNPs de 100 nm quando comparadas com suas homólogas menores (10 nm). Assim, foi observado que as AgNPs de 10 nm apresentam efeito tóxico a curto prazo similar ou maior do que a mesma concentração de partículas de 100 nm. No entanto, os efeitos genotóxicos e citotóxicos de longo prazo das AgNPs de 100 nm foram maiores do que os das partículas de 10 nm para ambas as linhagens celulares, comprovando que a exposição às AgNPs maiores (100 nm) pode causar mais efeitos biológicos adversos do que suas homólogas menores (10 nm).

Palavras Chave: Citotoxicidade, Genotoxicidade, Nanopartículas de prata, Teste do Micronúcleo, Ensaio Cometa.

ABSTRACT

SOUZA, T. A. J. **Effect of silver nanoparticles size in the induction of cytotoxic and genotoxic damage in CHO-K1 and CHO-XRS5 cell lines.** 2013. 78 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Due to their particular characteristics, nanoparticles (10^{-9} m) are being used in a range of products. However, these particles can cause adverse biological effects and because of that, there is a great concern about the health and environmental risks related to the use of these particles. Recently, silver nanoparticles (AgNPs) have been used in a variety of cytotoxicity and genotoxicity studies, but there are still controversies regarding the association between the size and the toxicity of these particles. Thus, in this study, we aimed to evaluate the cytotoxicity and genotoxicity of AgNPS (10 and 100 nm) in two different cell lines, CHO-K1 and CHO-XRS5, by performing Cell Viability assay (XTT), Clonogenic assay, Micronucleus test, Comet assay, as well as by investigating the Cell Cycle kinetics using the flow cytometry. For all the different assays, the cell cultures were exposed for 24 hours to different concentrations of AgNPs (0.025 to 5.0 μ g/ml) and the untreated cells were used as the negative controls. Since results from the Viability and Clonogenic assays indicated that the concentration of 5.0 μ g/ml was cytotoxic for both cell lines, this concentration was not included in the genotoxic assays. Our results indicated that the CHO-XRS5 cells presented a lower viability and higher levels of DNA damage compared to the CHO-K1 cells. The 10 nm-AgNPs induced greater levels of DNA damage than the 100 nm-particles in both cell lines and the former also led to a subG1 arrest soon after the treatment only in the CHO-K1 cell line. In contrast, results from all the other assays indicated that greater levels of toxicity were induced by the 100 nm-AgNPs when compared to the 10 nm-particles, both 24 and 72 h after the treatment. Thus, at the same concentration, the short-term effects of the 10 nm-AgNPs were equal to or more toxic than those of the 100 nm-particles. Nevertheless, both long-term genotoxicity and cytotoxicity induced by the 100 nm-AgNPs were greater than those induced by the 10 nm-particles for both cell lines, which suggests that the exposure to greater size particles (100 nm) can cause more adverse biological effects than the exposure to the smaller particles (10 nm).

Keywords: Cytotoxicity, Genotoxicity, Silver nanoparticles, Micronucleus assay, Comet assay.

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Nanotecnologia e nanopartículas: relevância e aplicações

Nanotecnologia é a manipulação da matéria ao nível molecular e atômico visando a fabricação de produtos com características e propriedades nanométricas (10^{-9} m) (DREXLER, 1986;1992). O conceito abordado pela nanotecnologia foi inicialmente descrito pelo físico Richard Feynman em 1959, porém o termo nanotecnologia foi proposto apenas em 1974 por Norio Taniguchi.

Com o avanço da nanotecnologia, tornou-se notório que os novos nanomateriais, com tamanhos na faixa entre 1 a 500 nm, apresentam propriedades diferentes em relação aos seus homólogos maiores. Tais propriedades dos nanomateriais estão relacionadas ao seu tamanho nanométrico e a sua alta reatividade sendo advindas de modificações fotoquímicas, ópticas, elétricas e catalíticas nas propriedades originais dos materiais (BAE et al., 2008; BOSANAC et al., 2008; GRANATIER; URBAN; SADLEJ, 2007; HENDERSON, 2008; KATO et al., 2009a,b; MÜLLER et al., 2008)

As diferenças nas propriedades físico-químicas dos nanomateriais podem ser atribuídas à sua alta relação superfície e volume. A dimensão nanométrica aliada à relação superfície/volume permite maior interação dessas partículas com biomoléculas presentes na superfície e no interior das células de tal forma que podem influenciar várias propriedades bioquímicas e físico-químicas dessas células (MODY; NOUNOU; BIKRAM, 2009; MODY et al. 2010).

A capacidade de interação entre os nanomateriais e as células, os tornaram excelentes candidatos para aplicações biomédicas em uma variedade de processos biológicos que ocorrem em escalas nanométricas, atuando, por exemplo, como vetores de genes e medicamentos. Dentre os nanomateriais utilizados para aplicações biomédicas, destacam-se as nanopartículas (NPs). Entretanto, para a utilização das NPs como vetores de medicamentos, é importante que os sistemas de NPs sejam estáveis, biocompatíveis e seletivamente direcionadas para locais específicos no organismo após sua administração sistêmica (MODY et al. 2010).

Sistemas alvo mais específicos podem ser utilizados para reconhecer as células-alvo, tais como células cancerosas. Isso pode ser obtido através da conjugação da nanopartícula à um ligante apropriado, o qual tem uma especificidade de ligação com as células-alvo. Além

disso, a utilização de NPs pode proporcionar uma plataforma na qual várias cópias da substância terapêutica utilizada podem se aderir, e assim aumentar a concentração de substâncias diagnósticas e terapêuticas no sítio patológico. Sendo assim, as NPs utilizadas como vetores de medicamentos, podem ser muito mais eficazes quando comparadas aos medicamentos tradicionais (DOBSON, 2006; MODY et al., 2010; YEZHELYEV et al., 2006).

Dentre os investimentos em nanotecnologia médica, as NPs metálicas, tais como as NPs magnéticas (óxido de ferro) e as NPs de ouro e prata nas suas mais variadas formas (nanocubos, nanoesferas, nanoconchas, nanogaiolas, etc) vêm recebendo especial atenção e têm sido continuamente utilizadas e manipuladas afim de permitir o seu emprego como agentes diagnósticos e terapêuticos (KHLEBTSOV; DYKMAN, 2010; MODY et al., 2010; YEZHELYEV et al. 2006) (Figura 1).

Além da utilização das NPs para a entrega direcionada de medicamentos, (RUDGE et al., 2001) e como vetores de genes e drogas (APPENZELLER, 1991; DOBSON, 2006; KANG et al., 1996; RUDGE et al., 2001;), elas estão sendo amplamente utilizadas para armazenamento eletrônico (KANG et al., 1996) e também nos diversos ramos da biotecnologia (PANKHURST et al., 2003).

Figura 1. Imagens de microscopia de transmissão (A,B,D-H) e de varredura (C) de estruturas nanométricas. A. Ouro na forma coloidal (15nm), B. Nanobastões de ouro (15x50nm) , C. Nanoconchas de sílica e de ouro (160/17nm), D. Nanoesferas de ouro (250nm) com partículas de ouro no seu interior (55nm), E. Cubos de Prata e Nanogaiolas de ouro (inserida), F. Nanoestrelas, G. Biopirâmides, Nanooctaedros. Fonte: Imagens adaptadas de Khlebtsov e Dykman (2010); Nehl, Liao e Hafner (2006); Ye et al. (2009); Chen et al. (2006); Liu et al. (2005); Li et al. (2008).

1.2. Nanopartículas de prata

A prata é utilizada na forma coloidal há mais de 100 anos e está registrada nos Estados Unidos como um material biocida desde 1954. No entanto apenas recentemente, avanços em nanotecnologia abriram novas áreas de aplicação para esse nanomaterial (NOWACK; KRUG; HEIGHT, 2011). Embora frequentemente descritas como sendo "de prata" as NPs de prata (AgNPs) são compostas por uma grande porcentagem de óxido de prata, devido à sua alta relação superfície/volume, o que proporciona à essas partículas um amplo substrato para a reação com o O₂ culminando com a formação de óxidos (MODY et al., 2010; NOWACK; KRUG; HEIGHT, 2011).

Normalmente, as AgNPs são sintetizadas pela redução de um sal de prata mediante um agente redutor como o boroidreto de sódio na presença de um estabilizador coloidal. Os estabilizadores coloidais mais comumente utilizados são o álcool polivinílico, o poli (vinilpirrolidona), a albumina de soro bovino (BSA), o citrato e a celulose. Métodos mais recentes incluem também o uso de i-d-glicose, como açúcar redutor, e amido como o estabilizador. Essas NPs ainda podem ser sintetizadas em diferentes formas e com intervalos de tamanho variados (p.ex.: 10 – 200 nm); sendo essas características importantes para as propriedades que elas apresentam. (ELECHIGUERRA et al., 2005; STEPANOV, 2002).

Atualmente, há um grande esforço para incorporar NPs de prata a uma ampla variedade de dispositivos usados em atividade médica, incluindo o cimento ósseo, instrumentos cirúrgicos, máscaras cirúrgicas, etc. Por outro lado, também tem sido demonstrado que a prata iônica, em dose específica, é adequada no tratamento de feridas (ATIYEH et al., 2007; LANSDOWN, 2006; QIN, 2005). Além disso, a utilização futura das AgNPs para o tratamento de doenças virais é cogitada devido à alta afinidade de adesão dessas NPs ao vírus HIV-1 (ELECHIGUERRA et al., 2005).

As AgNPs também apresentam excelentes propriedades anti-bacterianas (CHOI et al., 2010; MORONES et al., 2005) e segundo a Agência de Proteção Ambiental (EPA - *Environmental Protection Agency*), 53% dos produtos biocidas a base de prata registrados provavelmente contêm NPs de prata. Furno et al. 2004, por exemplo, desenvolveram biomateriais por impregnação de silicone revestido com NPs de óxido de prata. Esses novos biomateriais foram desenvolvidos com o objetivo de reduzir a infecção bacteriana. Os resultados obtidos relativos à eficiência bactericida dessas NPs foram díspares, mas a metodologia permitiu pela primeira vez a impregnação de polímeros contendo prata, o que

significou um grande passo para o início da confecção de biomateriais com propriedades antimicrobianas (FURNO et al., 2004).

Também tem sido foco de estudo o efeito bactericida dessas NPs de prata para a fabricação de plásticos, nas indústrias têxtil e de tintas (LEE; YEO; JEONG, 2003; ZUHUANG, 2003). Ainda exemplificando a abrangência da utilização das AgNPs pode-se citar produtos como roupas esportivas, toalhas de banho, desodorantes, pasta de dente e uma infinidade de outros produtos que exploram o potencial bactericida dessas NPs (Tabela 1).

Entretanto, da mesma forma como as AgNPs podem apresentar atividade antibacteriana, elas também podem causar danos neurológicos e embrionários. Em um estudo conduzido por Lyon et al. (2002), foi demonstrado que a prata pode atravessar a placenta e se concentrar no feto, gerando maiores concentrações de prata no feto do que na mãe (LYON et al., 2002).

Além disso, estudos com animais demonstraram que a exposição à prata pode prejudicar o desenvolvimento cerebral e gerar alterações de comportamento nos indivíduos adultos, pois sua inalação ou ingestão levou ao seu acúmulo no cérebro de roedores, alterando a expressão dos genes relacionados com o desenvolvimento neuronal. (RAHMAN et al., 2009; RUNGBY, 1990; WIJNHOFEN et al., 2009).

Todavia, as AgNPs não são apenas neuro e embriotóxicas. Existem várias evidências indicando a toxicidade das AgNPs em organismos aquáticos (ASHARANI et al., 2008; NAVARRO et al., 2008) e em células de mamíferos (ARORA et al., 2009; ASHARANI et al., 2009; LIU, W. et al., 2010; WISE et al., 2007), levantando a questão acerca do impacto biológico e ambiental das AgNPs.

Tabela 1. Exemplos de produtos que contêm NPs de prata.

Saúde	Curativos, anti-sépticos, camas e móveis hospitalares
Produtos domésticos	Amaciante de roupas, mamadeiras, recipientes para armazenar alimentos, tábuas de cozinha, cama, colchão, aspirador de pó, cortinas, persianas, porcelanas, utensílios para cozinha, cadeiras, acessórios de banho, lava louças, refrigeradores, máquinas de lavar roupas, assento sanitário, alavanca de descarga do vaso sanitário, embalagens de alimentos, bandejas de gelo, utensílios de cozinha de plástico, escova de cabelo, alisador de cabelo, pentes, escovas, rolos, toucas de banho. Pasta de dente, desodorantes cosméticos, escovas de dente, papel de seda, depilador, barbeador elétrico, shampoos para animais domésticos, comedouros e bebedouros, camas e abrigos para animais, papel, lápis, canetas, botões ATM, controle remoto, corrimãos de ônibus, teclados de computadores, secadores de mão, rádio comunicadores via wireless, tapete de yoga, capas para notebooks, calculadoras, plásticos protetores de folhas de papel, crachás, bilhetes de loja, produtos de armazenamento de mídia, laminação de filmes, capas de relatórios e pastas de projetos, porta retratos, livros de memória, acessórios de escritório, transparências, refrigeradores desmontáveis.
Vestuário	Roupas de bebê, roupas íntimas, meias, calçados, tecidos, toalhas de banho, colchas, sacos de dormir, roupas de cama, travesseiros, colchas, protetores de colchão e toalhas
Alimentos	Embalagens, criação de aves domésticas
Construção	Revestimento de maçanetas, tintas de parede, ar condicionado, piso de resina, revestimento de paredes, pisos antimicrobianos, sistemas de metal suspenso, persianas e sistemas de sombreamento, sistemas de prateleiras, madeira laminada decorativa, acessórios de fiação elétrica, superfícies laminadas, papel de parede, murais, tapetes, carpete, tampas de tanque, amassadeiras, portas de hospitais.
Desinfetantes	Desinfetantes agrícolas industriais, desinfetantes para aquicultura e desinfetantes piscina

Fonte: modificado e reproduzido de Mailhard e Hartemann (2012).

A presença de AgNPs no solo pode afetar as bactérias benéficas (responsáveis por serviços fundamentais aos ecossistemas, como fixação de nitrogênio e formação do solo) e assim alterar importantes funções ecológicas. Estudos *in situ* têm demonstrado que até mesmo AgNPs de grandes dimensões podem perturbar os processos de nitrificação e desnitrificação (CHOI; HU, 2008;. THROBACK et al., 2007).

A caracterização das AgNPs (por ex., estabilidade, liberação de íons e agregação) são essenciais para o entendimento dos impactos ambientais e biológicos (DARLINGTON et al., 2009; HASSELLOV et al., 2008; KLAINE et al., 2008; ZHANG et al., 2009) e são a base

para a validação e normatização dos resultados de diferentes experimentos de toxicidade (JIN et al., 2010; MURDOCK et al., 2008; NURMI et al., 2005).

A agregação de AgNPs modifica o seu tamanho e a morfologia, assim como a sua difusividade, os quais eventualmente podem influenciar a dispersão e a toxicidade induzida por essas NPs (AUFFAN et al., 2009; CHOI; HU, 2008; JIANG; OBERDÖRSTER; BISWAS, 2009; LIU, H et al., 2010; PAL; TAK; SONG, 2007; PARK et al., 2011). A agregação também reduz a área de superfície disponível para a oxidação diminuindo, potencialmente, a cinética de liberação de íons, a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e, consequentemente, a toxicidade das AgNPs (DORJNAMJIN; ARIUNAA; SHIM, 2008; LIU; HURT, 2010).

1.3. Genotoxicidade e citotoxicidade das nanopartículas

O *design* e o desenvolvimento de novas NPs têm sido de fundamental importância para a indústria, que explora as novas propriedades físico-químicas desses materiais em uma infinidade de novos artigos e produtos. Entretanto, o tamanho nanométrico dessas partículas aliado às suas características físico-químicas geram preocupações quanto aos seus efeitos biológicos, podendo representar riscos à saúde e ao meio ambiente (SINGH, 2009).

As NPs são capazes de penetrar no corpo através da deposição dérmica, da injeção na corrente sanguínea, da inalação e da ingestão, podendo ser transportadas através do sangue para diversos órgãos e sistemas do corpo por inúmeras vias (Figura 2A). A via nasal representa uma das principais vias de acesso das NPs ao corpo humano e devido ao seu tamanho nanométrico, essas partículas podem entrar na corrente sanguínea por meio dos alvéolos pulmonares (KRUG; WICK, 2011) (Figura 2B).

Uma vez dentro do corpo humano, as NPs podem entrar na célula por meio de uma série de mecanismos, tais como difusão passiva, endocitose mediada por receptores e endocitose mediada por clatrina. Após atingirem o meio intracelular, as NPs podem interagir com o material genético devido à sua permanência aleatória dentro do núcleo após a mitose, ou através dos poros nucleares se forem NPs de pequeno diâmetro (SINGH; RAMARAO, 2012; ZANG, 2009; SUMMERS, 2011) (Figura 3A).

Essas partículas podem danificar as organelas e outros componentes celulares e quando estão dentro do núcleo podem interagir diretamente com a molécula de DNA ou com proteínas associadas ao DNA podendo induzir danos ao material genético (CHEN et al., 2005; GEISER et al., 2005).

Além dos danos físicos - causados pela interação direta das NPs com os componentes celulares e com o DNA - a elevada proporção superfície/volume destes nanomateriais pode promover a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs). Atualmente, a geração de EROs é considerada a maior causadora de toxicidade das NPs (OBERDÖRSTER; OBERDÖRSTER; OBERDÖRSTER, 2005). A exposição às NPs pode comprometer, por meio da formação de EROs, a cascata de sinalização celular que controla a proliferação celular, processos inflamatórios mediados pelos fatores de transcrição NFkB e AP1 e morte celular por apoptose. O ataque oxidativo ao DNA tem se mostrado um dos efeitos que governam a genotoxicidade de NPs, pois podem causar quebras cromossômicas, formação de aductos de DNA, modificações de histonas, metilação e alterações na expressão da proteína supressora tumoral p53 (KARLSSON et al., 2008; PAPAGEORGIOU et al., 2007; SINGH et al. 2009) (Figura 3B).

Considerando que as AgNPs compreendem atualmente uma das principais NPs comercializadas, estando em maior contato com a população humana, a avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade dessas NPs tornam-se tópicos extremamente importantes para a nanotoxicologia. O potencial genotóxico e citotóxico das NPs e de outros agentes físicos e químicos têm sido analisados por meio de testes citogenéticos *in vitro* tais como Ensaio Cometa e Teste do Micronúcleo. Além disso, o estudo e a identificação de agentes capazes de induzir danos no DNA são essenciais para a segurança da saúde, uma vez que as mutações estão envolvidas na iniciação e promoção da carcinogênese e outras doenças. (FOLDBJERG, 2010; HUSSAIN et al., 2005; NALLATHAMBY; XU, 2010; TAKAHASHI, 2003).

Figura 2. A. Visão geral das rotas de translocação das NPs no corpo humano. As setas sólidas representam as rotas descritas e demonstradas na literatura e as setas tracejadas representam rotas hipotéticas. Fonte: modificado e reproduzido de Krug e Wick (2011), Oberdorster et al. (2005).

Figura 2. B. Ilustração dos possíveis passos seguidos pelas NPs após serem inaladas. Fonte: modificado e reproduzido de Krug e Wick, (2011).

Figura 3. A. Ilustração dos possíveis mecanismos de captação celular de diversos nanomateriais, incluindo difusão passiva, endocitose mediada por receptores celulares e endocitose mediada pela clatrina.

Fonte: modificado e reproduzido de Singh et al. (2009)

Figura 3. B. Esquema dos mecanismos genotóxicos das NPs. A exposição das células às NPs pode induzir estresse oxidativo e/ou respostas inflamatórias que por sua vez, tem o potencial de danificar o DNA e alterar os padrões de transcrição.

Fonte: modificado e reproduzido de Singh et al. (2009).

1.4. Utilização das linhagens CHO para avaliação de citotoxicidade e genotoxicidade

As células de Ovário de Hamster Chinês (CHO) estão bem caracterizadas, apresentam um curto tempo de geração (12 a 14 h); possuem cromossomos grandes e em pequeno número ($2n=20$ a 22) quando comparado aos cariótipos humanos ($2n=46$) e de camundongos ($2n=40$), e podem ser congeladas e estocadas para serem utilizadas em ensaios futuros (PRESTON, 1981). Sendo assim, são consideradas como sistema modelo em estudos citogenéticos. Além disso, essas células possuem um crescimento estável em cultura, apresentando geralmente, um grande número de metáfases analisáveis (PRESTON; SAN SEBASTIAN; McFEE, 1987).

Devido a essas inúmeras vantagens, as linhagens celulares CHO vêm sendo muito utilizadas em estudos de toxicidade e mutagenicidade para uma grande variedade de agentes químicos e físicos (PRESTON et al., 1981). As diversas linhagens mutantes do sistema CHO foram criadas a partir de mutações induzidas no locus *HGPRT* (hipoxantina fosforribosiltransferase), utilizando a resistência ao 6-Tioguanina (TG) como um marcador para reconhecer mutantes *HGPRT*, o que permite a avaliação da base gene específica do dano. A Tioguanina (TG) é letal para células de mamíferos normais e a resistência a este análogo purínico resulta de uma alteração ou perda da enzima (HGPRT) (AARON; STANKOWSKI, 1989).

As células do tipo selvagem (enzima-competentes) não formam colônias, pois elas são capazes de converter a TG no nucleotídeo tioguanina monofosfato e acabam morrendo em consequência do acúmulo de metabólitos tóxicos da TG (SIMINOVITCH, 1976). A seleção de mutantes, combinada com o recente desenvolvimento de protocolos de biologia molecular permitiu o *screening* de deleções e mutações específicas nos genes *HPRT*, *GPT* e *XRCC5* (AARON; STANKOWSKI, 1989).

Esta seleção de linhagens com mutações específicas foi de extrema importância para a investigação dos mecanismos de reparo do DNA (MOTHERSILL; SEYMOUR, 1993). Isto pôde levar a uma melhor identificação de lesões no DNA, responsáveis pelos diferentes tipos de efeitos biológicos induzidos (DARROUDI; NATARAJAN, 1987, 1989).

As células CHO-XRS são conhecidas por serem deficientes em sua capacidade de reparar quebras de fita dupla no DNA, sendo mais eficientes no reparo de quebras de fita simples (COSTA; BRYANT, 1988; DARROUDI e NATARAJAN, 1987, 1989; KEMP; JEGGO, 1986). A deficiência decorre da incapacidade dessas células de realizar a recombinação V(D)J corretamente. O gene *XRCC5*, defeituoso nessa linhagem, codifica a

Ku80, um componente da proteína Ku e da proteína quinase DNA-dependente (JEGGO; KEMP, 1983; KEMP; JEGGO, 1986).

A Ku é uma proteína nuclear associada com a ligação das regiões terminais do DNA, um dos passos envolvidos no reparo das quebras da fita de DNA. A proteína Ku é um complexo heterodimérico composto por duas subunidades: uma com um peso molecular de aproximadamente 70 kD (Ku70) e outra de aproximadamente 80 kD (Ku80). Este complexo protéico se liga especificamente às regiões finais do duplex de DNA. A subunidade Ku80 é identificada como sendo produto do gene *XRCC5*. Células que possuem deficiência neste gene apresentam ausência de atividade de ligação das regiões terminais do DNA (ZDZIENICKA, 1995).

As linhagens mutantes *XRS* fornecem uma oportunidade única de se investigar o papel das quebras de fita dupla e o mecanismo de rearranjo dessas quebras na produção de aberrações cromossômicas (BRYANT, 1984; NATARAJAN et al., 1980; NATARAJAN; OBE, 1984). Esta particularidade é importante, pois torna possível avaliar se estes mecanismos estão envolvidos na ação toxicológica das AgNPs. Nesse sentido, a utilização de uma linhagem deficiente para reparo de quebras de fita dupla, a linhagem CHO-XRS torna-se interessante, pois permite avaliar o potencial genotóxico de AgNPs, já que tem sido descrita na literatura a ação dessas partículas na indução de danos no DNA e, mais especificamente, na indução de quebras de fita dupla (AHAMED et al., 2008; ASHARANI; HANDE; VALIYAV, 2009; ASHARANI et al., 2009).

Assim, neste trabalho foram avaliadas a citotoxicidade e a genotoxicidade de AgNPs em duas linhagens de Ovário de Hamster Chinês: CHO-K1 e CHO-XRS-5, sendo que a linhagem CHO-K1 é uma linhagem selvagem e a linhagem CHO-XRS-5 é uma linhagem com deficiência para reparo de quebra de fita dupla, com o intuito de verificar os efeitos citotóxicos e genotóxicos das AgNPs com tamanhos nominais de 10 e 100 nm em ambas as linhagens. Para tanto, foram realizados os experimentos de Viabilidade Celular (XTT), Sobrevivência Clonogênica, Ensaio Cometa, Teste do Micronúcleo e Ensaio da Cinética do Ciclo Celular por Citometria de Fluxo.

O estudo de NPs de diferentes diâmetros se torna necessário devido ao fato de terem sido observadas variações de citotoxicidade e genotoxicidade utilizando-se NPs de diferentes tamanhos. (GAISER et al., 2012; GORTH; RAND; WEBSTER, 2011; JOHNSTON et al., 2010; KIM et al., 2011; LIU, H. et al. 2010; ORDZHONIKIDZE et al., 2009; PANDA et al., 2011; PARK, M et al., 2011; POWERS et al., 2011; SINGH; RAMARAO, 2012; ZHANG et. al., 2009). Park, M et al. (2011), por exemplo, verificaram nas linhagem de fibroblastos

L929 e macrófagos RAW 264.7, que as partículas de 20 nm são mais tóxicas do que suas homólogas de 80 e 113 nm. As partículas de 20 nm também demonstraram ser mais tóxicas do que suas homólogas maiores (50 nm), quando administradas em linhagens de células humanas A549, SGC-7901, HepG2 e MCF-7 (LIU, W. et al., 2010).

O mesmo padrão de toxicidade foi verificado por Liu H. et al. (2010) ao constatarem que AgNPs pequenas (3-4 nm) possuem propriedades bactericidas mais eficazes contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, porém são mais tóxicas do que suas homólogas maiores (10-40 nm). Além destes trabalhos, muitos outros apontam para a maior toxicidade das AgNPs menores em relação às suas homólogas maiores (GAISER et al., 2012; KIM et al., 2011; ORDZHONIKIDZE et al., 2009; PANDA et al., 2011). No entanto, este padrão de toxicidade não foi observado por Powers et al. (2011) que constatarem maior indução de estresse oxidativo por parte das AgNPs de 50 nm em relação às suas homólogas de 10 nm. Esta toxicidade tamanho-dependente também foi verificada quando o parâmetro analisado foi a ontogenia de *Drosophila*, sendo que neste caso as AgNPs maiores (100-500 nm) demonstraram ser mais tóxicas que suas homólogas menores (20-30 nm) (GORTH; RAND; WEBSTER, 2011).

Portanto, considerando-se que a relação do tamanho das NPs é uma questão em discussão em relação aos seus efeitos citotóxicos e genotóxicos levantou-se a hipótese de que o tratamento com partículas de 10 e 100 nm poderia apresentar efeitos citotóxicos e genotóxicos e também induzir danos no DNA com maior frequência na linhagem CHO-XRS5 (por ser uma linhagem deficiente para o reparo de quebras duplas induzidas pelas AgNPs) relativamente à linhagem CHO-K1 e que a toxicidade das NPs de 10 nm poderia ser maior do que as NPs de 100 nm em ambas as linhagens celulares, devido à maior relação superfície/volume dessas partículas.

2. Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a citotoxicidade e a genotoxicidade de AgNPs de diferentes tamanhos (10 e 100 nm) nas concentrações de 0,025 a 5 µg/mL em células das linhagens CHO-K1 e CHO-XRS-5 de ovário de Hamster Chinês.

2.2. Objetivos Específicos

1) Avaliar a citotoxicidade das AgNPs mensurando a viabilidade celular e capacidade clonogênica das linhagens CHO-K1 e CHO-XRS5 por meio do Ensaio de Viabilidade Celular (XTT) e do Ensaio de Sobrevivência Clonogênica respectivamente.

2) Verificar o efeito genotóxico das AgNPs por meio da indução de danos no DNA investigada pelo Ensaio Cometa e também de mutações cromossômicas com o emprego do Teste do Micronúcleo.

3) Avaliar a cinética do ciclo celular após 0, 24 e 72 h de recuperação do tratamento com AgNPs por Citometria de Fluxo.

4) Realizar uma comparação entre as AgNPs de 10 e 100 nm, inferindo as diferenças de citotoxicidade e genotoxicidade relacionadas ao tamanho das AgNPs.

3. Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Nanopartículas de prata (AgNPs)

Foram utilizadas AgNPs de 10 e 100 nm em solução aquosa (0,02 mg/mL) com citrato de sódio como estabilizador, obtidas e caracterizadas pela empresa SIGMA-ALDRICH (Tabelas 2 e 3).

Tabela 2. Correlação entre o diâmetro, concentração de massa e concentração de partículas das AgNPs fornecidas pela empresa Sigma Aldrich.

AgNPs	Concentração (mg/mL)	Concentração (AgNPs/mL)
10 nm	0,02	3.6×10^{12}
100 nm	0,02	3.6×10^9

Tabela 3. Características (composto estabilizador, concentração, fluorescência, índice de refração e diâmetro médio) das AgNPs de 10 e 100 nm fornecidas pela empresa Sigma Aldrich.

Características	AgNPs 10 nm	AgNPs 100 nm
Estabilizador	citrato de sódio	citrato de sódio
Concentração	0.02 mg/mL em solução aquosa	0.02 mg/mL em solução aquosa
Fluorescência	λ_{em} 388 nm, FWHM 59 nm	λ_{em} 504 nm, FWHM 167 nm
Índice de Refração	n _{20/D} 1.333	n _{20/D} 1.333
Diâmetro Médio	10 nm $\pm$ 4 nm (TEM)	100 nm $\pm$ 7 nm (TEM)

3.2. Linhagens Celulares

No presente trabalho foram utilizadas as linhagens celulares de ovário de hamster chinês CHO-K1 e CHO-XRS5 gentilmente cedidas ao Laboratório de Citogenética e Mutagênese - FMRP/USP, Ribeirão Preto, pelo Dr. Adayapalam Tyagarajan Natarajan (State University of Leiden, Holanda).

3.3. Cultivo Celular

As linhagens CHO-K1 e CHO-XRS5 estavam previamente estocadas em nitrogênio líquido (-195 °C), em alíquotas de 1×10^6 células/mL em uma solução de congelamento (50% meio de cultura, 50% soro bovino fetal e 10% glicerol).

Para a realização dos experimentos, as células foram descongeladas e cultivadas em frascos de cultura de 25 cm² de área a 37 °C, 5% CO₂, contendo 10 mL de meio de cultura Ham-F10+D-MEM na proporção 1:1 (Sigma) suplementado com:

- 10% de soro bovino fetal (SBF) (Cultilab),
- 1,2 g/L de bicarbonato de sódio (Reagen),
- 0,06 g/L penicilina, 0,10 g/L de estreptomicina (Sigma),
- 1% de Kanamicina (Gibco),
- 1% de Ciprofloxacina (forma comercial Hifloxan® – Halexistar)
- HEPES (2,38 g/L – Serva)

3.4. Controles Experimentais

No presente trabalho foram utilizados dois agentes como controle positivo; a doxorubicina (DXR) e o metil metano sulfonato (MMS). A DXR foi utilizada no Teste do Micronúcleo e na avaliação da Cinética do Ciclo Celular por Citômetria de Fluxo enquanto o metil metano sulfonato foi utilizado nos Ensaios de Sobrevivência Clonogênica, Viabilidade Celular e Cometa.

3.4.1. Doxorubicina

A doxorubicina (DXR) é um antibiótico, da família das antraciclinas, utilizado para tratamento de neoplasias malignas (Figura 4A). Sua aplicação em ensaios para mutagênese e antimutagênese, deve-se a sua capacidade de provocar danos ao DNA (ANTUNES et al., 1999; QUILES et al., 2002). Os mecanismos propostos para a ação citotóxica ou citostática da doxorubicina são: intercalação na fita de DNA e, como consequência, a inibição da síntese de macromoléculas; formação de radicais livres, o que provoca danos no DNA, peroxidação lipídica, ligação à fita de DNA e alquilação; ligações cruzadas no DNA; interferência na abertura da dupla fita de DNA; interferência na atividade da helicase; ação direta na membrana celular; inibição da topoisomerase II; indução de morte celular por apoptose (GEWIRTZ, 1999).

No presente trabalho foi utilizado o agente DXR na sua forma comercial Doxolem®: Cloridrato de doxorubicina (Registro CAS #23214-92-8 e 25316-40-9, Eurofarma Laboratórios Ltda, Campo Belo – SP, Brasil e Zodiac Produtos Farmacêuticos S/A, Pindamonhangaba – SP, Brasil. A DXR foi utilizada na concentração de 0,15µg/mL.

3.4.2. Metil Metano Sulfonato

O metil metano sulfonato (MMS) possui um mecanismo de ação mais restrito em relação à doxorubicina. Ele age através da transferência de grupamentos metil e etil em determinadas posições de bases nitrogenadas, sendo assim, caracterizado como um agente alquilante (Figura 4B). Mais especificamente o MMS atua metilando a guanina e a timina nas posições O₆ e O₄ respectivamente (BERANEK, 1990).

Essas modificações químicas alteram as propriedades de pareamento das bases, o que acarreta no mau pareamento da guanina metilada com a timina na posição O₆ e a produção de transições do tipo GC-AT. Já a timina alquilada causa transições do tipo TA-CG na posição O₄. Essas alterações levam à quebras de fita simples, as quais podem ser facilmente identificadas pelo Ensaio Cometa. Portanto, o MMS tem sido utilizado como controle positivo para o Ensaio Cometa (HACKENBERG et al., 2011). O MMS foi obtido da empresa Sigma Aldrich e utilizado na concentração 200 µM.

Figura 4. Estrutura molecular da doxorrubicina (A) e do metil metano sulfonato (B)

Fonte: Disponível em: <http://en.wikipedia.org/wiki/Methyl_methanesulfonate>. Acesso em 8 de maio. 2013
<<http://pt.wikipedia.org/wiki/Doxorrubicina>>. Acesso em: 8 de maio. 2013

3.4.3. Controle negativo

O meio de cultura Ham-F10+DMEM na ausência de qualquer tratamento foi utilizado como controle negativo nos experimentos.

3.5. Dispersão Dinâmica de Luz

A Dispersão Dinâmica de Luz (DLS- (*dynamic light scattering*) analisa a distribuição da velocidade do movimento das partículas através da medida das flutuações dinâmicas da intensidade de dispersão de luz provocada pelo movimento Browniano das partículas. Esta técnica produz um raio hidrodinâmico, ou o diâmetro, que é calculado através da equação de Stokes-Einstein a partir das referidas medidas mencionadas acima (Figura 5).

Figura 5. Esquema representativo da medida de DLS, a qual utiliza a dispersão da luz provocada pelo movimento Browniano das partículas, para inferir o tamanho delas em solução.

Fonte da imagem: Mike Jones – Disponível em: <http://en.wikipedia.org/wiki/Dynamic_light_scattering>. Acesso em: 8 de mai. de 2013.

A DLS das AgNPs de 10 e 100 nm foi analisada em meio HAM-F10 + DEM suplementado com 10% de SBF na concentração de 100 µg/mL, com o intuito de caracterizar o tamanho e potencial zeta das NPs no meio utilizado para o cultivo das linhagens celulares. Para isso utilizou-se o instrumento Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments) no Centro de Nanotecnologia e Engenharia Tecidual do Departamento de Química da FFCLRP/USP, Ribeirão Preto.

O método utilizado pelo Zetasizer Nano-ZS, para medir o potencial zeta das partículas em solução, é conhecido como *laser Doppler velocimetry* (LDV). Essa técnica utiliza um laser incidindo através da amostra, para medir a velocidade das partículas em um campo elétrico aplicado. Para verificar o efeito da aglomeração, foram realizadas medidas nos tempos 0 e 24 h após a diluição das partículas em meio de cultura completo.

Assim, foram obtidos o tamanho médio (diâmetro em nm) e o índice de polidispersão (PdI), calculado pelo instrumento. Esse índice varia de 0 a 1, sendo que valor 0 representa suspensões monodispersas e o valor 1 suspensões polidispersas. Foram realizadas três medidas independentes e o desvio padrão foi calculado para essas medidas.

3.6. Ensaios para a avaliação da citotoxicidade das nanopartículas de prata (AgNPs)

3.6.1. Ensaio de Viabilidade Celular (XTT)

Para mensurar a viabilidade celular nos diferentes tratamentos foi utilizado o “Cell Proliferation Kit II” (Roche Applied Science). Essa técnica é baseada na metabolização do sal amarelo tetrazolium XTT que resulta na formação de um corante formazan alaranjado. (Figura 6). Essa metabolização é feita apenas por células viáveis.

Assim, com este experimento foi possível mensurar a viabilidade celular após a exposição a diferentes concentrações de AgNPs (0,025-5,0 µg/mL). Para tanto, as células foram semeadas (3×10^4 células) e após 24 h de cultivo foram expostas por um período de 24 h às concentrações de 0,025-5,0 µg/mL de AgNPs, em placas de 24 poços.

Após a exposição, os poços foram lavados por duas vezes com solução de Hank's, sendo posteriormente adicionados 250 µL de meio DMEM sem fenol e 30 µL de XTT/electron (na proporção de 50:1), em cada poço. Essa solução foi deixada durante 40 minutos nas placas de cultura e depois transferida para uma cubeta, para a análise no

espectrofotômetro Ultrospec™ 2100 pro UV com comprimento de onda de 492 e 690 nm.

Figura 6. Esquema da metabolização do sal XTT no produto formazan.

Fonte: reproduzido de Wang; Yu e Wickliffe (2011).

3.6.2. Ensaio Clonogênico

Ensaio Clonogênico ou Teste de Sobrevivência Clonogênica, é um ensaio *in vitro* baseado na capacidade de uma única célula de se dividir e formar uma colônia. A colônia é definida como sendo composta por, pelo menos, 50 células. O ensaio, essencialmente, testa a capacidade de cada célula, na população, de sofrer divisões “ilimitadas”. Na realidade, este é o método comumente utilizado para detecção de morte celular decorrente da incapacidade da célula em se dividir (FRANKEN et al., 2006).

Assim, as células em crescimento exponencial foram semeadas em um número de 300 células/frasco 25 cm². Após um período de 8 h da semeadura - tempo suficiente para que as células se fixassem ao frasco de cultura e inferior ao tempo de duplicação das células (para garantir que o número de células semeadas seja o mesmo de células tratadas) - as células foram expostas à diferentes concentrações de AgNPs (0.025, 0.25, 1.25, 2.5 e 5 µg/mL) por 24 h. Cada tratamento foi feito em triplicata. As células foram incubadas em estufa a 37°C, 5% CO₂ e após 10 dias as colônias foram contadas. Após este período, as colônias formadas foram fixadas (metanol/ácido acético/água na proporção 1:1:8 v/v) e coradas com solução de Giemsa. A contagem foi realizada com o auxílio de uma estereomicroscópio.

3.7. Ensaios para a avaliação da genotoxicidade das nanopartículas de prata (AgNPs)

3.7.1. Ensaio Cometa

O Ensaio Cometa (também conhecido como um teste de eletroforese em gel de uma única célula) é uma técnica quantitativa e rápida que permite a mensuração do DNA danificado em células eucarióticas, através de evidências visuais (LIAU; MCNUTT; ZHU, 2009). Em comparação com outros métodos sensíveis, o Ensaio Cometa é relativamente preciso e econômico no uso de materiais (ROJAS; LOPEZ; VALVERDE, 1999). O ensaio em questão foi desenvolvido por Singh et al. (1988) e seu princípio básico consiste inicialmente, da lise de membranas celulares e proteínas nucleares (incluindo as histonas), e subsequentemente, da descompactação do DNA sob condições alcalinas (SINGH, 2000). Em seguida, efetua-se a indução da migração eletroforética do DNA liberado em matriz de agarose. O Ensaio Cometa é assim denominado, pois quando visto ao microscópio, a migração do DNA adquire a forma aparente de um cometa, com cabeça - a região nuclear, e a cauda - que contem fragmentos ou fitas de DNA que migraram na direção do anodo (KLAUDE et al., 1996).

O Ensaio Cometa vem sendo proposto para estudos de toxicogenética devido às suas peculiaridades e vantagens quando comparado a outros testes para a detecção de substâncias genotóxicas. Este ensaio não é utilizado para detectar mutações, mas sim lesões genômicas que, após serem processadas, podem resultar em mutação. Diferente das mutações, as lesões detectadas pelo teste cometa são passíveis de correção. Assim sendo, este ensaio pode também ser utilizado para estudos de reparo do DNA, trazendo informações importantes sobre a cinética e o tipo de lesão reparada. (GONTIJO; TICE, 2003).

Uma vez que os danos no DNA são frequentemente célula e tecido específicos, uma metodologia como o Ensaio Cometa - que permite a detecção de danos e seu reparo em uma única célula e, conseqüentemente, em determinada subpopulação celular - é de extrema relevância para a avaliação de compostos genotóxicos. A versão alcalina deste ensaio é usada para detectar tanto quebras de fita simples e duplas como sítios alcali-lábeis nas moléculas de DNA, as quais são induzidas, por exemplo, por radiações ionizantes, agentes alquilantes, oxidantes, etc. (GONTIJO; TICE, 2003).

Para o Ensaio Cometa, as células foram semeadas (1×10^5) e posteriormente expostas às AgNPs de 10 e 100 nm por 24 h, em frascos de 25 cm². Após o tratamento as culturas foram lavadas duas vezes com solução de Hank's e as células suspensas por tripsinização. Antes da realização do Ensaio Cometa (EC) foi realizado um teste de viabilidade celular a fim de assegurar que pelo menos 70% das células mantidas em cultura estavam viáveis. Para tanto, foi utilizado o método de exclusão por azul de Trypan 0,4% para determinar a

viabilidade das culturas, o qual consistiu em retirar 10 μ L de suspensão celular e misturar com 10 μ L de solução de azul de Trypan 0,4% por 10 minutos.

As células inviáveis coram-se em azul (por apresentarem a membrana celular lesionada) e as viáveis não são coradas (membrana celular íntegra). A viabilidade foi calculada em porcentagem, dividindo-se o número de células viáveis pelo total de células contadas. Para a realização do Ensaio Cometa foram consideradas apenas as culturas que apresentassem viabilidade superior a 70%. Após a realização do ensaio de viabilidade, 500 μ L da suspensão celular foram transferidos para um microtubo de 1,5 mL e submetidos à centrifugação de 1.000 rpm, a 4°C, por 5 minutos.

Na etapa seguinte, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensionado sendo acrescentados 160 μ L de agarose de baixo ponto de fusão (37°C), 0,5%, com leve homogeneização. Então, o material de cada microtubo foi transferido para duas lâminas recém-preparadas com uma camada de agarose de ponto de fusão normal 1,5% e cobertas com lamínulas, sendo, em seguida, incubadas a 4°C por 5 minutos.

Posteriormente, as lamínulas foram retiradas cuidadosamente e as lâminas foram mergulhadas em solução de lise a 4°C (NaCl 2,5 M, Na₂EDTA 100 mM, Tris 10 mM, Triton X-100 1% e DMSO 10%, pH 10,0) por 24 h. As lâminas foram retiradas desta solução e mergulhadas em solução tampão de eletroforese (NaOH 0,3 M e Na₂EDTA 1 mM, pH > 13) por 20 minutos, sendo posteriormente submetidas à eletroforese por 20 minutos em corrente eletroforética de 25 V [1 V/cm, 300 mA] a 4°C. Logo após, as lâminas foram mergulhadas em solução de neutralização (Tris-HCl 0,4 M, pH 7,5) por 15 minutos.

Em seguida, as lâminas foram secas à temperatura ambiente e então fixadas em etanol 100%. Para a coloração do material, foram adicionados 30 μ L de solução de SYBR Green 2X sobre a lâmina, sendo esta recoberta por uma lamínula. O material foi analisado em microscópio de fluorescência (ZEISS, filtro 516- 560 nm e barreira de filtro de 590 nm), em aumento de 40x.

O princípio utilizado no ensaio cometa para mensurar o dano no DNA é comparativo e por isso foi necessária a presença de um controle positivo (MMS- 200 μ M) e um negativo para os experimentos. Esses parâmetros tornam-se necessários para a comparação, pois o próprio metabolismo celular pode gerar 1000 lesões diárias no DNA/célula, assim, não existem células sem dano (GONTIJO; TICE, 2003).

3.7.2. Teste do micronúcleo

O teste do micronúcleo (MN) evoluiu para o teste conhecido, atualmente, como teste citoma. O termo citoma implica que a viabilidade celular (necrose ou apoptose), o status mitótico e o dano cromossômico de cada célula podem ser quantificados (FENECH, 1997). Matter e Schmid (1971) estabeleceram o teste do micronúcleo em células de medula óssea de camundongos, sendo sua versão *in vitro* com cultura de linfócitos periféricos humanos, proposta como um teste para a detecção de agentes carcinogênicos (HEDDLE, 1976). Segundo Salvadori; Ribeiro; Fenech (2003), essa versão evoluiu rapidamente no campo da genética toxicológica por ser um método simples para a avaliação de vários tipos de danos citogenéticos, além das contínuas inovações em seu protocolo demonstrando a ampliação da aplicabilidade do teste.

Atualmente o teste do micronúcleo (MN) é uma metodologia amplamente utilizada para mensurar quebras cromossômicas, erros de reparo do DNA, perdas cromossômicas, não-disjunção, necrose, apoptose e efeitos citostáticos. Esse é o teste mais utilizado para medir micronúcleos em culturas humanas e em outros mamíferos, pois avalia apenas as células binucleadas que já se dividiram, permitindo a identificação de MN mais facilmente (FENECH, 1997).

O MN pode ser definido como uma pequena massa nuclear delimitada por membrana e separada do núcleo principal que se forma durante a telófase da mitose ou meiose, quando o envoltório nuclear é reconstituído ao redor das células filhas. Desse modo, são resultantes de fragmentos cromossômicos acêntricos ou de cromossomos inteiros que se perderam do núcleo principal. Assim sendo, o MN representa perda de cromatina em consequência de dano cromossômico estrutural (fragmento) ou dano no aparelho mitótico (FENECH, 1997).

Outro marcador importante de danos que se pode observar por meio desse teste é o número de pontes nucleoplasmáticas (PN). As PN são marcadores de instabilidade genômica que se expressam como ligações contínuas entre os núcleos das células binucleadas. São resultantes de rearranjos cromossômicos envolvendo mais de um centrômero (ex. cromossomos dicêntricos) ou cromátides que migram para polos opostos da célula durante a anáfase. Para a realização do teste do micronúcleo as células foram expostas por 24 h à diferentes concentrações de AgNPs (0.025, 0.25, 1.25, 2.5 µg/mL). Após o tratamento foi administrada citocalasina B (CitB) às células por 18 h - período maior do que um ciclo mitótico das células CHO (12-14h) porém menor do que o período correspondente a dois

ciclos delas - com o objetivo de se obter o maior número possível de células binucleadas analisáveis.

A CitB (Sigma), foi diluída em dimetilsulfóxido (DMSO – Sigma) a fim de se obter uma solução de uso na concentração de 1 mg/mL. Esta solução foi mantida ao abrigo da luz em refrigeração a 4°C, até o momento de seu uso na concentração final de 5 µg/mL de meio de cultura. Esta substância é um agente inibidor da polimerização da proteína actina, requerida para a formação do anel de microfilamentos que induzem a contração do citoplasma e clivagem da célula em duas células filhas (citocinese) (CARTER, 1967). Esta inibição da citocinese resulta no acúmulo de células binucleadas, a partir de células que passaram por apenas um ciclo de divisão.

Após 18 h da aplicação da citocalasina, as células foram lavadas por duas vezes com solução de Hank's, tripsinizadas e centrifugadas por 5 minutos a 1000 r.p.m. O *pellet* foi então ressuspenso em solução hipotônica gelada (KCl-0,075 M) com posterior homogeneização cuidadosa com auxílio de pipeta Pasteur. Essa suspensão celular foi centrifugada novamente por 5 minutos a 1000 r.p.m. e ressuspendida em 3 mL de fixador (metanol/ácido acético 3:1 v/v). Este passo foi repetido por mais uma vez e, o sobrenadante descartado. A suspensão celular foi gotejada em lâminas limpas anteriormente imersas em água destilada a 4°C. As lâminas foram coradas com solução de Giemsa (Na₂HPO₄ 0,06M e KH₂PO₄ 0,06M-pH 6,8) por 10 minutos, lavadas com água destilada, secas ao ar e submetidas à análise.

Foram analisadas 1000 células binucleadas com citoplasma bem preservado. Os critérios para identificação de micronúcleos foram baseados em Fenech (2007) (Figura 7).

O índice de divisão nuclear (IDN) foi determinado pela análise de 500 células por lâmina. Somente as células com o citoplasma bem preservado, contendo de 1 a 4 núcleos foram computadas com auxílio de contador de células digital e microscópio de luz transmitida (Figura 7). O IDN foi calculado de acordo com Eastmond e Tucker (1989), usando-se a seguinte fórmula:

$$IDN = [M1 + 2(M2) + 3(M3) + 4(M4)] / N$$

M1 - M4 são os números de células com 1, 2, 3 e 4 núcleos, respectivamente;

N é o número total de células analisadas.

Figura 7. Esquema representativo do experimento de micronúcleo e dos parâmetros analisados neste teste (Índice de Divisão Nuclear, Frequência de Micronúcleos e Frequência de Pontes Nucleoplasmáticas).

Fonte: Elaborada pelo autor.

3.7.3. Cinética do Ciclo Celular por Citometria de Fluxo

O ensaio da cinética do ciclo celular por citometria de fluxo mensura a integralidade do período de divisão, analisando a porcentagem de células em cada uma das fases da interfase (subG1, G1, S e G2). Esse ensaio é realizado com auxílio de um citômetro, pois é uma metodologia capaz de acompanhar a distribuição das células nas diferentes fases do ciclo em função de diversos estímulos ou da adição de drogas e outros compostos. (GIVAN, 2001)

A análise realizada pelo citômetro se dá através de um laser de um único comprimento de onda (cor), o qual que é direcionado a um meio líquido em fluxo contendo células. Existem detectores apontados para a região onde o fluxo passa através do laser e também perpendiculares a esta região, além de detectores de fluorescência. Cada célula suspensa passando através do feixe dispersa a luz de uma forma, e os corantes químicos fluorescentes encontrados na célula ou juntos a ela podem ser excitados emitindo luz de menor frequência em relação ao da fonte de luz. Essa combinação de luz dispersa e fluorescente é melhorada pelos detectores, e analisando as flutuações de brilho de cada detector (uma para cada pico de

emissão fluorescente) é possível explorar vários tipos de informação sobre a estrutura física e química de cada célula (GIVAN, 2001).

Para a realização da cinética do ciclo celular as células foram tratadas por 24 h com diferentes concentrações (0.025, 0.25, 1.25, 2.5 e 5 µg/mL) de AgNPs (10 e 100 nm) e colhidas imediatamente após o tratamento (0 h), 24 e 72 h depois. No momento da colheita o meio foi removido e guardado, enquanto as células foram lavadas com PBS (1x), tripsinizadas e coletadas com o meio previamente guardado. As células foram centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos. Neste momento o sobrenadante (meio de cultura) foi removido e o *pellet* foi lavado com PBS. As células foram novamente centrifugadas (1000 rpm por 5 minutos) e, após a centrifugação, o PBS foi removido e o *pellet* foi ressuspensionado em 2 mL de etanol 70% gelado, e mantido a -20° C até o momento da leitura no citômetro de fluxo.

Antes da leitura das amostras, o material armazenado a -20° C foi centrifugado (1000 rpm por 5 minutos) e o etanol 70% foi removido. O *pellet* foi ressuspensionado em 1 mL de PBS gelado e novamente centrifugado. Após a centrifugação o PBS foi removido e as células ressuspensionadas em 200 µL da solução de iodeto de propídeo. Após 30 minutos de incubação o material foi analisado no citômetro de fluxo Guava CytoSoft 4.2.1 e Software Environment (Guava Technologies).

4. Análise Estatística

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram realizados três experimentos independentes para cada parâmetro analisado (Viabilidade Celular, Capacidade Clonogênica, Incidência de danos no DNA, Frequência de Micronúcleos e Pontes Nucleoplasmáticas, Índice de Divisão Mitótica e Cinética do Ciclo Celular). Os resultados dos experimentos foram expressos como média e desvio padrão. Os dados dos grupos tratados foram comparados ao controle negativo dos respectivos experimentos. Os dados em todo o trabalho foram analisados usando os testes “One Way ANOVA” e Bonferroni. O valor $p < 0,05$ foi considerado como significativo. Para a realização dos testes usou-se o programa estatístico Sigma Stat para Windows Versão 3.5, Jandel Corporation.

5. Resultados

5. RESULTADOS

5.1. Dispersão Dinâmica de Luz

Por meio da técnica de Dispersão Dinâmica da Luz (DLS - *Dynamic Light Scattering*) foi possível obter informações importantes para a caracterização das AgNPs de 10 e 100 nm, tais como os valores relativos ao tamanho médio (diâmetro em nm) e ao índice de polidispersão (PdI). As partículas de 100 nm apresentaram maior estabilidade quando em solução aquosa e em meio de cultura, apresentando pouca variação de diâmetro e dispersão nesses dois ambientes. Por outro lado, as partículas de 10 nm apresentaram maiores variações de diâmetro e um índice de polidispersão maior do que as partículas de 100 nm, sendo um indicativo de que, essas partículas tendem a aglomerar mais do que as de 100 nm.

Os diâmetros e a dispersão das partículas pouco variaram após 24 h, tanto na ausência como na presença do meio de cultura, o que demonstra que as partículas não tendem a se aglomerar quando o parâmetro em questão é o tempo, demonstrado estabilidade de tamanho em relação ao tempo. Além disso, notamos que há um aumento do tamanho hidrodinâmico quando as NPs são diluídas em meio de cultura suplementado com 10% de soro bovino fetal, isso fornece indícios da interação entre as partículas e os constituintes, tais como proteínas, presentes no meio de cultura. É importante notar que os diâmetros das AgNPs obtidos pela análise por DLS diferem dos fornecidos pelo fabricante, os quais foram obtidos por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). Entretanto, devido à maior precisão da MET para determinar o diâmetro das partículas, os dados nominais fornecidos pela Sigma-Aldrich foram considerados para efeito de comparação (Figura 8; Tabelas 3 e 4).

Figura 8. Valores de dispersão das partículas (pdI) de 10 e 100 nm isoladas e em meio de cultura obtidos pela leitura no Zetasizer Nano-ZS

Tabela 4. Diâmetro das AgNPs em solução aquosa e no meio de cultura obtido pelo Zetasizer Nano-ZS

		Diâmetro (nm)			
		0 h		24 h	
		Média (%)	DP(±)	Média (%)	DP(±)
10 nm	s/ meio de cultura	239,07	57,63	260,90	25,61
	c/ meio de cultura	269,90	64,70	273,40	56,56
100 nm	s/ meio de cultura	158,87	35,73	134,75	15,29
	c/ meio de cultura	188,83	16,41	229,17	115,19

Foram realizados três experimentos independentes, (±) DP: Desvio Padrão

5.2. Ensaio de Viabilidade Celular (XTT)

Foram realizados experimentos de viabilidade celular com as linhagens CHO-K1 e CHO-XRS5 utilizando o “Cell Proliferation Kit II” (XTT) para avaliar a resposta dessas linhagens ao tratamento com diversas concentrações de AgNPs (0,025 µg/mL; 0,25 µg/mL; 1,25 µg/mL; 2,5 µg/mL; 5,0 µg/mL). Em ambas as linhagens foram observadas diferenças significativas entre o controle negativo e a concentração 5,0 µg/mL das AgNPs de 10 e 100 nm; a viabilidade celular nessa concentração foi de 15 e 17% para as células CHO-K1 tratadas com AgNPs de 10 e 100 nm respectivamente e de 33 e 28% para as células CHO-XRS5 tratadas com AgNPs de 10 e 100 nm respectivamente, como consequência, esta concentração foi excluída dos ensaios de genotoxicidade.

Foi verificada diferença significativa entre o controle negativo e as células da linhagem CHO-K1 tratadas com a concentração 2,5 µg/mL de AgNPs de 100 nm. A diferença significativa foi constatada devido à diminuição da viabilidade celular nesta concentração, porém o valor se aproximou aos 70% de viabilidade celular, valor aceitável para a realização de ensaios genotóxicos (Figura 9; Tabela 5).

A partir da curva dose resposta obtida por meio dos ensaios de viabilidade celular, calculou-se a IC₅₀ da viabilidade celular *in vitro* após 24 h de exposição das células CHO-K1 e CHO-XRS5 às AgNPs. Observou-se que os valores de IC₅₀ foram menores nas células da linhagem CHO-XRS5 em comparação com as células da linhagem CHO-K1, sendo que o menor valor foi encontrado nas células da linhagem CHO-XRS5 tratadas com as AgNPs de tamanho 100 nm (Tabela 6).

Figura 9. Avaliação da viabilidade celular das linhagens CHO-K1 e CHO-XRS5 em resposta aos tratamentos (24 h) com 5 concentrações de AgNPs (0,025; 0,25; 1,25; 2,5; 5 µg/mL) de diferentes dimensões (10 e 100 nm). CN: controle negativo; CP: controle positivo- MMS- 200 µM – tratamento por 3 h. As células foram colhidas 24 h após o tratamento e foram analisadas pelo Cell Proliferation Kit II (XTT). Foram realizados três experimentos independentes.

Tabela 5: Porcentagem de células das linhagens CHO-K1 e CHO-XRS5 viáveis após o tratamento por 24 h com cinco concentrações de AgNPs de 10 e 100 nm. Para a realização do ensaio foi utilizado o “Cell Proliferation Kit II” (XTT):

Viabilidade Celular (%)								
Tratamento µg/mL	CHO-K1				CHO-XRS5			
	10 nm		100 nm		10 nm		100 nm	
	Média (%)	DP (±)	Média (%)	DP (±)	Média (%)	DP (±)	Média (%)	DP (±)
CN	100	14	100	12	100	25	100	12
CP	79	7	113	3	90	27	72	24
0,025	110	10	116	4	98	10	80	4
0,25	79	6	102	10	96	1	90	11
1,25	133	0,6	115	2	88	3	67	13
2,5	81	11	67*	16	77	11	73	9
5,0	15*	5	17*	5	33*	1	28*	7

(*) Diferença estatisticamente significativa quando comparada ao controle negativo ($p < 0,05$).

CN: controle negativo; CP: controle positivo – MMS - 200 µM - tratamento por 3 h.

Foram realizados três experimentos independentes, sendo cada experimento realizado em duplicata. (±) DP: Desvio Padrão

Tabela 6. Concentrações de AgNPs de 10 e 100 nm responsáveis por inibir 50% da viabilidade (kit XTT) das linhagens CHO-K1 e CHO-XRS5, 24 h após a exposição.

AgNPs	IC ₅₀ (µg/mL)			
	CHO-K1		CHO-XRS5	
	Média	(±) DP	Média	(±) DP
10 nm	5,64	2,55	4,80	1,33
100 nm	4,44	1,95	3,24	1,42

Valores de IC₅₀ ±DP (µg/mL)

5.3. Sobrevivência Clonogênica

No presente trabalho, foi avaliada a capacidade clonogênica das células CHO-K1 e CHO-XRS5 após a exposição às AgNPs sendo verificada uma diminuição dose-dependente no número de colônias formadas após 10 dias do término do tratamento (24 h). Houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre o controle negativo e as células CHO-K1 expostas à concentração de 5µg/mL de AgNPs de 10 e 100 nm. Também, foi verificada baixa capacidade clonogênica nas células CHO-XRS5, o que resultou em um pequeno número de colônias e os valores sofreram alterações importantes entre os experimentos independentes o que gerou grandes valores de desvio padrão.

Estes fatores contribuíram para a ausência de diferença significativa entre o controle negativo e os cinco tratamentos com AgNPs nesta linhagem. No entanto, observamos que em ambas as linhagens celulares houve um pequeno número de colônias formadas quando expostas à maior concentração (5µg/ml) de AgNPs nos dois tamanhos avaliados (10 e 100 nm), de tal forma que essa concentração não foi utilizada para a realização dos ensaios genotóxicos (Figura 10, Tabela 7). O cálculo da IC₅₀ também foi feito para a capacidade das linhagens CHO-K1 e CHO-XRS5 em formar colônias. Os valores de IC₅₀ foram menores na linhagem CHO-XRS5 em comparação com a linhagem CHO-K1, sendo que o menor valor de IC₅₀ foi encontrada nas células da linhagem CHO-XRS5 tratadas com AgNPs de 100 nm (Tabela 8), corroborando os resultados obtidos com o experimento de viabilidade com ensaio XTT (Tabela 6).

Figura 10. Efeito dos tratamentos com cinco concentrações (0,025; 0,25; 1,25; 2,5; 5 µg/mL) de AgNPS (10 e 100 nm) sobre o número de colônias formadas das linhagens CHO-K1 e CHO-XRS5. CN: controle negativo; CP: controle positivo - DXR - 0,15 µg/mL - tratamento por 24 h). As 300 células semeadas ficaram expostas às AgNPs por 24 h e após 10 dias foi avaliada a sua capacidade clonogênica. Foram realizados três experimentos independentes, sendo que cada experimento foi feito em duplicata. (*) Diferença estatisticamente significativa quando comparada ao controle negativo ($p < 0,05$). Barra de erros: $\pm$ Desvio Padrão

Tabela 7. Porcentagem do número de colônias das células das linhagens CHO-K1 e CHO-XRS5 após o tratamento por 24 h com cinco concentrações de AgNPs de 10 e 100 nm.

Sobrevivência Clonogênica								
Tratamento µg/mL	CHO-K1				CHO-XRS5			
	10 nm	100 nm	10 nm	100 nm	10 nm	100 nm	10 nm	100 nm
	Média (%)	DV ($\pm$)	Média (%)	DV ($\pm$)	Média (%)	DV ($\pm$)	Média (%)	DV ($\pm$)
CN	100	24	100	9	100	21	100	8
CP	77	9	69*	13	24	19	31	32
0.025 µg/mL	81	3	88	4	56	42	59	58
0.25 µg/mL	71	25	90	21	46	7	63	55
1.25 µg/mL	81	14	89	2	86	64	49	51
2.5 µg/mL	70	13	83	7	59	50	58	50
5.0 µg/mL	50*	1	47*	1	25	9	29	16

(*) Diferença estatisticamente significativa quando comparada ao controle negativo ($p < 0,05$).

CN: controle negativo; CP: controle positivo - DXR - 0,15 µg/mL - tratamento por 24 h).

Foram realizados três experimentos independentes, sendo cada experimento realizado em duplicata. ($\pm$) DP: Desvio Padrão

Tabela 8. Concentrações de AgNPs de 10 e 100 nm responsáveis por inibir 50% formação de colônias das linhagens CHO-K1 e CHO-XRS5.

Ensaio Clonogênico (10 dias)				
IC ₅₀ (µg/mL)				
	CHO-K1		CHO-XRS5	
AgNPs	Média	(±) DP	Média	(±) DP
10 nm	4,89	1,50	2,59	2,25
100 nm	6,63	1,34	1,64	1,86

Valores de IC₅₀ ±DP (µg/mL)

5.4. Ensaio Cometa

O ensaio cometa foi empregado com o objetivo de mensurar os danos no DNA nas linhagens CHO-K1 e CHO-XRS5 expostas ao tratamento por 24 h com diferentes concentrações (0,025-2,5 µg/mL) de AgNPs de 10 e 100 nm. Foi observado nível estatisticamente maior de dano ($p < 0,05$) em ambas as linhagens celulares tratadas com as concentrações de 1,25 e 2,5 µg/mL de AgNPs de 10 e 100 nm quando comparadas com o controle negativo. Os maiores valores percentuais de dano no DNA foram encontrados na concentração 2,5 µg/mL das linhagens CHO-K1 (45% de DNA na cauda) e CHO-XRS5 (52% de DNA na cauda) expostas à AgNPs de 10 nm, o que demonstra que logo após o tratamento essas partículas induzem maior número de lesões no DNA do que as NPs de 100 nm (Figura 11, Tabela 9).

Figura 11. Danos no DNA detectados e mensurados pelo ensaio cometa (% de DNA na cauda) nas linhagens CHO-K1 e CHO-XRS5 expostas por 24 h à AgNPs de 10 e 100 nm. CN: Controle Negativo; CP: Controle Positivo – MMS - 200 µM- tratamento por 3 h). Foram realizados três experimentos independentes, sendo que cada experimento foi realizado em duplicata. (*) Diferença estatisticamente significativa quando comparada ao controle negativo ($p < 0,05$). Barra de erros: $\pm$ Desvio Padrão

Tabela 9. Porcentagem de danos no DNA detectados e mensurados pelo ensaio cometa (% de DNA na cauda) nas linhagens CHO-K1 e CHO-XRS5 expostas por 24 h à AgNPs de 10 e 100 nm.

Ensaio Cometa								
Tratamento µg/mL	CHO-K1				CHO-XRS5			
	10 nm		100 nm		10 nm		100 nm	
	Média (%)	DV ($\pm$)	Média (%)	DV ($\pm$)	Média (%)	DV ($\pm$)	Média (%)	DV ($\pm$)
CN	5	2	5	2	5	1	6	2
CP	49*	5	42*	5	40*	5	59*	13
0,025	12	4	7	3	10	4	20	2
0,25	22*	1	12	3	13	2	21	2
1,25	28*	2	20*	5	31*	11	24*	2
2,5	45*	6	42*	8	52*	5	41*	5

(*) Diferença estatisticamente significativa quando comparada ao controle negativo ($p < 0,05$).

CN: controle negativo; CP: controle positivo – MMS - 200 µM- tratamento por 3 hora.

Foram realizados 3 experimentos independentes, sendo cada experimento realizado em duplicata. ($\pm$) DP: Desvio Padrão

5.5. Teste do Micronúcleo

5.5.1. Índice de Divisão Nuclear

No presente trabalho foi empregado o índice de divisão nuclear (IDN), um dos parâmetros analisados no Teste do Micronúcleo, para avaliar a capacidade das células de sofrerem mitose após serem expostas ao agente em estudo (AgNP). Os valores de IDN verificados na linhagem CHO-K1 foram maiores em relação aos observados na linhagem CHO-XRS5. Os valor do IDN dos controles negativos da linhagem CHO-K1 tratada com AgNPs de 10 nm e 100 nm foi de 1,78, sendo que esse valor foi de 1,69 nas células da linhagem CHO-XRS5 tratadas com AgNPs de 10 e 100 nm. Em ambas as linhagens foi possível observar uma progressiva diminuição nos valores do IDN com o aumento das concentrações das NPs. Os decréscimos mais acentuados foram observados nas células de ambas as linhagens expostas à concentração de 2,5 $\mu\text{g/mL}$ de AgNPs de 100 nm (Figura 12, Tabela 10).

Figura 12. Valores do IDN das células das linhagens CHO-K1 e CHO-XRS5 após a exposição por 24 h à AgNPs de 10 e 100 nm. CN; Controle Negativo; DXR: doxorubicina (0,15 $\mu\text{g/mL}$ - tratamento por 3 h). Foram realizados três experimentos independentes, sendo que cada experimento foi realizado em duplicata. (*) Diferença estatisticamente significativa quando comparada ao controle negativo ($p < 0,05$). Barra de erros: $\pm$ Desvio Padrão

5.5.2. Frequência de Células Binucleadas Micronucleadas

A média de células com micronúcleos do controle negativo dos experimentos das células CHO-K1 tratadas com AgNPs de 10 nm foi sete e o dos experimentos das células CHO-K1 tratadas com AgNPs de 100 nm foi nove, sendo que para a linhagem CHO-XRS5, as médias dos controles negativos foram de 18 nos experimentos das células tratadas tanto com AgNPs de 10 nm como com AgNPs de 100 nm (Tabela 10). De maneira geral, houve uma frequência maior de micronúcleos nas células da linhagem CHO-XRS5 comparativamente à linhagem CHO-K1, não apenas no controle positivo como também em todos os demais tratamentos. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre o controle negativo a concentração 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de AgNPs de 10 nm nas células da linhagem CHO-K1 e nas células da linhagem CHO-XRS5 tratadas com AgNPs de 100 nm, sendo que no último caso foi verificado o maior número de células com micronúcleos dentre os tratamentos com AgNPs (Figura 13, Tabela 10).

Figura 13. Frequência de Micronúcleos (MN) em 1000 células binucleadas das linhagens CHO-K1 e CHO-XRS5 expostas por 24 h à AgNPs de 10 e 100 nm. CN; Controle Negativo; CP; Controle Positivo - DXR - 0,15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ - tratamento por 3 h. Foram realizados três experimentos independentes, sendo que cada experimento foi realizado em duplicata. (*) Diferença estatisticamente significativa quando comparada ao controle negativo ($p < 0,05$). Barra de erros: $\pm$ Desvio Padrão

5.5.3. Frequência de Células Binucleadas com Pontes Nucleoplasmáticas

Da mesma maneira como foi identificado para a frequência de micronúcleos, foi verificado um número maior de pontes nucleoplasmáticas no controle positivo e em todos os tratamentos na linhagem CHO-XRS5 comparativamente à linhagem CHO-K1. O maior número de pontes nucleoplasmáticas foi verificado nas células CHO-XRS5 tratadas com AgNPs de 100 nm (Figura 14; Tabela 10).

Figura 14. Frequência de Pontes Nucleoplasmáticas (PN) nas células das linhagens CHO-K1 e CHO-XRS5 após a exposição por 24 h à AgNPs de 10 e 100 nm. CN; Controle Negativo; CP: DXR - 0,15 µg/mL - tratamento por 3 h. Foram realizados três experimentos independentes, sendo que cada experimento foi realizado em duplicata. (*) Diferença estatisticamente significativa quando comparada ao controle negativo ($p < 0,05$). Barra de erros: $\pm$ Desvio Padrão

Tabela 10. Índice de divisão nuclear, frequência de micronúcleos e pontes nucleoplasmáticas observadas após 24 h de exposição à AgNPs de 10 e 100 nm nas linhagens de celulares CHO-K1 e CHO-XRS5.

		CHO-K1				CHO-XRS5			
Tratamento		10 nm		100 nm		10 nm		100 nm	
μg/mL		Média	(±) DP	Média	(±) DP	Média	(±) DP	Média	(±) DP
Índice de Divisão Nuclear IDN	CN	1,78	0,05	1,78	0,01	1,69	0,03	1,69	0,02
	CP	1,73	0,02	1,75	0,02	1,51*	0,05	1,55	0,01
	0,025	1,78	0,09	1,78	0,12	1,67	0,08	1,69	0,09
	0,25	1,78	0,03	1,75	0,03	1,66	0,09	1,66	0,04
	1,25	1,80	0,06	1,77	0,02	1,65	0,04	1,59	0,06
	2,50	1,73	0,04	1,71	0,07	1,66	0,03	1,58	0,07
Frequência de MN	CN	7	2	9	4	18	11	18	6
	CP	22*	5	29*	9	104*	9	112*	18
	0,025	8	2	9	3	26	8	33	3
	0,25	7	3	12	5	25	4	29	5
	1,25	13	4	11	5	28	3	33	5
	2,50	18*	4	17	2	35	5	59*	14
Frequência de PN	CN	3	2	2	1	9	6	9	6
	CP	7	3	8*	1	27*	6	25	5
	0,025	6	4	2	1	8	4	18	12
	0,25	7	5	2	2	8	3	17	10
	1,25	4	4	2	2	5	2	15	11
	2,50	6	2	5	2	8	1	24	5

(*) Diferença estatisticamente significativa quando comparada ao controle negativo (p<0,05).

CN: controle negativo; CP: controle positivo – DXR - 0,15 μg/mL - tratamento por 3 h.

Foram realizados três experimentos independentes, sendo cada experimento realizado em duplicata. (±) DP: Desvio Padrão

5.6. Ciclo Celular

5.6.1. Linhagem CHO-K1

Imediatamente após o tratamento, as células CHO-K1 tratadas com AgNPs de 10 nm apresentaram menor porcentagem de células na fase subG1 quando comparadas com aquelas tratadas com AgNPs 100 nm em praticamente todas as concentrações com exceção da maior concentração (5 µg/mL), na qual 25% das células CHO-K1 tratadas com AgNPs de 10 nm sofreram um aumento de células na fase subG1 em comparação com apenas 15% das células desta linhagem tratadas com as partículas de 100 nm. Não foi verificada diferença significativa entre o controle negativo e os diferentes tratamentos com AgNPs de 10 e 100 nm em nenhuma das fases do ciclo (subG1, G1, S, G2) (Figura 15, 21 e 22, Tabela 11).

Após 24 h do tratamento, houve um aumento significativo entre o controle negativo e a maior concentração 5 µg/mL nas fases subG1 e G1 e ainda na fase G2 das células tratadas com 10 nm. Foi observado um aumento expressivo na toxicidade das NPs de 100 nm após 24 h de exposição, pois a porcentagem de células tratadas com essas partículas na fase subG1 aumentou de 15% (0 h) para 40% (24 h). Já no caso das partículas de 10 nm, foi observado um decréscimo na porcentagem de células em subG1, de 24% (0 h) para 10% (24 h) (Figuras 15, 21 e 22; Tabela 12). Finalmente, 72 h após o tratamento, os níveis de subG1 retornaram ao nível de subG1 das células do controle negativo. Mesmo com essa redução foi verificada diferença significativa entre o controle negativo e as células tratadas com 5 µg/mL de AgNPs de 100 nm nas fases subG1, G1 e S, enquanto para AgNPs de 10 nm não houve diferença significativa (Figura 17, 21 e 22, Tabela 13).

5.6.2. Linhagem CHO-XRS5

As células CHO-XRS5 tratadas com a maior concentração (5 µg/mL) de AgNPs de 10 e 100 nm apresentaram uma diminuição significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle negativo das células nas fases S e G2, sendo que as células tratadas com partículas de 100 nm também apresentaram um aumento significativo ($p < 0,05$) entre o controle negativo e a concentração de 5 µg/mL na fase subG1. Ao contrário do que foi observado na linhagem CHO-K1, na linhagem CHO-XRS5 as células tratadas com AgNPs de 100 nm apresentaram

maior porcentagem de células em subG1 (29%) em relação às células tratadas com AgNPs de 10 nm (21%) (Figuras 18, 23 e 24; Tabela 14).

Decorridas 24 h do tratamento foi observado um grande aumento na toxicidade das AgNPs de 100 nm, pois a porcentagem de células em subG1 aumentou de 29% (0 h) para 93% (24 h) e um ligeiro aumento na toxicidade das AgNPs de 10 nm de 21% (0 h) para 30% (24 h). Foi observado um aumento significativo ($p<0,05$) entre o controle negativo e as células tratadas com 5 $\mu\text{g/mL}$ de AgNPs de 10 nm nas fases subG1 e G1, sendo que nas células tratadas com NPs de 100 nm foi observado um aumento significativo ($p<0,05$) da porcentagem de células em subG1 e uma diminuição significativa ($p<0,05$) da porcentagem de células em G1, S e G2 (Figura 19, 23 e 24, Tabela 15). Decorridas 72 h após o tratamento foi observada uma diminuição da toxicidade das AgNPs, pois os padrões de porcentagem de células nas diferentes fases do ciclo foram semelhantes ao controle negativo; com exceção das células tratadas com a maior concentração de AgNPs (5 $\mu\text{g/mL}$) de 100 nm, as quais apresentaram uma diminuição significativa ($p<0,05$) em relação ao controle negativo na fase G1. Além disso, também foi observada uma alta porcentagem de células na fase subG1 tratadas com 5 $\mu\text{g/mL}$ de 100 nm, reforçando o efeito tardio dessas partículas quando comparadas com as de 10 nm (Figura 20, 23 e 24, Tabela 16).

Figura 15. Porcentagem de células observadas nas fases subG1, G1, S e G2 do ciclo celular da linhagem CHO-K1 analisada pelo citômetro de fluxo Guava CytoSoft 4.2.1 com a utilização do software Environment (Guava Technologies) imediatamente (0 h) após a exposição por 24 h à AgNPs de 10 e 100 nm. Foram realizados três experimentos independentes. (*) Diferença estatisticamente significativa quando comparada ao controle negativo ($p<0,05$). Barra de erros: $\pm$ Desvio Padrão; CN: controle negativo; CP: controle positivo - CP - DXR - 0,15 $\mu\text{g/mL}$

Figura 16. Porcentagem de células observadas nas fases subG1, G1, S e G2 do ciclo celular da linhagem CHO-K1 analisada pelo citômetro de fluxo Guava CytoSoft 4.2.1 com a utilização do software Environment (Guava Technologies) 24 h após a exposição por 24 h à AgNPs de 10 e 100 nm. Foram realizados três experimentos independentes. (*) Diferença estatisticamente significativa quando comparada ao controle negativo ($p < 0,05$). Barra de erros: $\pm$ Desvio Padrão; CN: controle negativo; CP: controle positivo - CP - DXR - 0,15 µg/mL

Figura 17. Porcentagem de células observadas nas fases subG1, G1, S e G2 do ciclo celular da linhagem CHO-K1 analisada pelo citômetro de fluxo Guava CytoSoft 4.2.1 com a utilização do software Environment (Guava Technologies) 72 h após a exposição por 24 h à AgNPs de 10 e 100 nm. Foram realizados três experimentos independentes. (*) Diferença estatisticamente significativa quando comparada ao controle negativo ($p < 0,05$). Barra de erros: $\pm$ Desvio Padrão; CN: controle negativo; CP: controle positivo - CP - DXR - 0,15 µg/mL

Figura 18. Porcentagem de células observadas nas fases subG1, G1, S e G2 do ciclo celular da linhagem CHO-XRS5 analisada pelo citômetro de fluxo Guava CytoSoft 4.2.1 com a utilização do software Environment (Guava Technologies) imediatamente (0 h) após a exposição por 24 h à AgNPs de 10 e 100 nm. Foram realizados três experimentos independentes. (*) Diferença estatisticamente significativa quando comparada ao controle negativo ($p < 0,05$). Barra de erros: $\pm$ Desvio Padrão; CN: controle negativo; CP: controle positivo - CP - DXR - 0,15 µg/mL

Figura 19. Porcentagem de células observadas nas fases subG1, G1, S e G2 do ciclo celular da linhagem CHO-XRS5 analisada pelo citômetro de fluxo Guava CytoSoft 4.2.1 com a utilização do software Environment (Guava Technologies) 24 h após a exposição por 24 h à AgNPs de 10 e 100 nm. Foram realizados três experimentos independentes. (*) Diferença estatisticamente significativa quando comparada ao controle negativo ($p < 0,05$). Barra de erros: $\pm$ Desvio Padrão; CN: controle negativo; CP: controle positivo - CP - DXR - 0,15 µg/mL

Figura 20. Porcentagem de células observadas nas fases subG1, G1, S e G2 do ciclo celular da linhagem CHO-XRS5 analisada pelo citômetro de fluxo Guava CytoSoft 4.2.1 com a utilização do software Environment (Guava Technologies) 72 h após a exposição por 24 h à AgNPs de 10 e 100 nm. Foram realizados três experimentos independentes. (*) Diferença estatisticamente significativa quando comparada ao controle negativo ($p < 0,05$). Barra de erros: $\pm$ Desvio Padrão; CN: controle negativo; CP: controle positivo - CP - DXR - 0,15 µg/mL

Figura 21. Representação gráfica da porcentagem de células da linhagem CHO-K1 em cada uma das fases do ciclo celular (subG1, G1, S e G2) na ausência de qualquer tratamento (controle negativo) e 0, 24 e 72 h após o tratamento com a concentração 5 µg/mL de AgNPs de 10 nm.

Figura 22. Representação gráfica da porcentagem de células da linhagem CHO-K1 em cada uma das fases do ciclo celular (subG1, G1, S e G2) na ausência de qualquer tratamento (controle negativo) e 0, 24 e 72 h após o tratamento com a concentração 5 μg/mL de AgNPs de 100 nm.

Figura 23. Representação gráfica da porcentagem de células da linhagem CHO-XRS5 em cada uma das fases do ciclo celular (subG1, G1, S e G2) na ausência de qualquer tratamento (controle negativo) e 0, 24 e 72 h após o tratamento com a concentração 5 µg/mL de AgNPs de 10 nm.

Figura 24. Representação gráfica da porcentagem de células da linhagem CHO-XRS5 em cada uma das fases do ciclo celular (subG1, G1, S e G2) na ausência de qualquer tratamento (controle negativo) e 0, 24 e 72 h após o tratamento com a concentração 5 µg/mL de AgNPs de 100 nm.

Tabela 11. Valores percentuais de células nas fases subG1, G1, S e G2 do ciclo celular da linhagem CHO-K1 analisada pelo citômetro de fluxo Guava CytoSoft 4.2.1 com a utilização do software Environment (Guava Technologies) 0 h após o tratamento com AgNPs de 10 e 100 nm.

Ciclo Celular (0 h)																
CHO-K1																
Tratamento (µg/mL)	Sub G1				G1				S				G2			
	10 nm		100 nm		10 nm		100 nm		10 nm		100 nm		10 nm		100 nm	
	Média	DP (±)	Média	DP (±)	Média	DP (±)	Média	DP (±)	Média	DP (±)	Média	DP (±)	Média	DP (±)	Média	DP (±)
CN	1	1	5	5	51	3	55	3	17	2	12	1	31	3	27	3
CP	57*	34	9	11	27	19	46	5	8	7	12	3	7*	8	31	3
0,025	1	0	7	7	55	5	56	7	18	1	14	2	26	5	22	1
0,25	1	0	6	5	49	2	52	1	19	6	14	2	30	6	27	5
1,25	2	0	5	4	40	6	58	2	16	2	10	1	42	4	25	4
2,5	3	1	5	4	45	3	58	4	15	3	13	2	37	3	25	7
5	24	14	15	14	35	4	52	10	16	1	8	3	24	12	25	5

(*) Diferença estatisticamente significativa quando comparada ao controle negativo (p<0,05).

CN: controle negativo; CP: controle positivo - DXR - 0,15 µg/mL.

Foram realizados três experimentos independentes, sendo cada experimento realizado em duplicata. (±) DP: Desvio Padrão

Tabela 12. Valores percentuais de células nas fases subG1, G1, S e G2 do ciclo celular da linhagem CHO-K1 analisada pelo citômetro de fluxo Guava CytoSoft 4.2.1 com a utilização do software Environment (Guava Technologies) 24 h após o tratamento com as AgNPs de 10 e 100 nm.

Ciclo Celular (24 h)																
CHO-K1																
Tratamento (µg/mL)	Sub G1				G1				S				G2			
	10 nm		100 nm		10 nm		100 nm		10 nm		100 nm		10 nm		100 nm	
	Média	DP (±)	Média	DP (±)	Média	DP (±)	Média	DP (±)	Média	DP (±)	Média	DP (±)	Média	DP (±)	Média	DP (±)
CN	2	1	16	7	63	1	48	3	14	1	15	2	22	1	21	6
CP	2	0	19	4	62	2	47	3	16	0	11	1	21	2	23	2
0,025	2	2	14	2	64	4	51	2	13	3	14	2	22	2	21	1
0,25	1	1	14	6	62	1	53	3	15	2	13	2	22	2	20	1
1,25	1	0	11	0	61	3	51	1	14	3	13	1	24	2	25	1
2,5	1	0	11	6	62	1	48	2	13	2	15	2	25	2	25	1
5	10*	1	40*	4	48*	1	31*	2	15	2	10	3	28*	2	19	2

(*) Diferença estatisticamente significativa quando comparada ao controle negativo (p<0,05).

CN: controle negativo; CP: controle positivo – DXR - 0,15 µg/mL .

Foram realizados três experimentos independentes, sendo cada experimento realizado em duplicata. (±) DP: Desvio Padrão

Tabela 13. Valores percentuais d3 células nas fases subG1, G1, S e G2 do ciclo celular da linhagem CHO-K1 analisada pelo citômetro de fluxo Guava CytoSoft 4.2.1 com a utilização do software Environment (Guava Technologies) 72 h após o tratamento com AgNPs de 10 e 100 nm.

Ciclo Celular (72 h)																
CHO-K1																
Tratamento (µg/mL)	Sub G1				G1				S				G2			
	10 nm		100 nm		10 nm		100 nm		10 nm		100 nm		10 nm		100 nm	
	Média	DP (±)	Média	DP (±)	Média	DP (±)	Média	DP (±)	Média	DP (±)	Média	DP (±)	Média	DP (±)	Média	DP (±)
CN	4	2	1	0	70	1	69	3	6	2	8	1	18	3	22	3
CP	4	1	2	0	66	1	69	3	7	1	9	1	21	1	20	2
0,025	4	1	2	1	68	4	72	4	7	1	7	1	21	2	19	4
0,25	4	1	1	0	69	2	70	1	8	2	7	1	18	2	22	1
1,25	2	1	1	1	69	2	67	0	7	1	9	2	21	2	23	3
2,5	3	1	1	0	70	0	70	2	8	0	10	1	19	1	20	3
5	4	1	3*	1	64	3	59*	5	15	10	13*	1	17	9	24	3

(*) Diferença estatisticamente significativa quando comparada ao controle negativo (p<0,05).

CN: controle negativo; CP: controle positivo – DXR - 0,15 µg/mL.

Foram realizados três experimentos independentes, sendo cada experimento realizado em duplicata. (±) DP: Desvio Padrão

Tabela 14. Valores percentuais de células nas fases subG1, G1, S e G2 do ciclo celular da linhagem CHO-XRS5 analisada pelo citômetro de fluxo Guava CytoSoft 4.2.1 com a utilização do software Environment (Guava Technologies) 0 h após o tratamento com AgNPs de 10 e 100 nm.

Ciclo Celular (0 h)																
CHO-XRS5																
Tratamento (µg/mL)	Sub G1				G1				S				G2			
	10 nm		100 nm		10 nm		100 nm		10 nm		100 nm		10 nm		100 nm	
	Média	DP (±)	Média	DP (±)	Média	DP (±)	Média	DP (±)	Média	DP (±)	Média	DP (±)	Média	DP (±)	Média	DP (±)
CN	9	8	13	3	34	1	33	3	12	1	12	2	45	7	42	7
CP	13	1	34*	1	13*	2	9*	1	6*	1	5*	1	68*	3	52*	4
0,025	7	3	10	3	36	2	34	4	14	1	13	2	43	3	43	1
0,25	5	2	12	2	38	3	31	3	12	2	10	0	45	3	47	2
1,25	5	3	13	1	41	5	36	2	13	2	11	0	41	0	39	1
2,5	4	2	16	1	44	5	35	3	12	2	10	1	40	2	38	2
5	21	7	29*	2	42	5	38	2	6*	1	6*	1	31*	3	28*	1

(*) Diferença estatisticamente significativa quando comparada ao controle negativo (p<0,05).

CN: controle negativo; CP: controle positivo - DXR - 0,15 µg/mL .

Foram realizados três experimentos independentes, sendo cada experimento realizado em duplicata. (±) DP: Desvio Padrão

Tabela 15. Valores percentuais das células nas fases subG1, G1, S e G2 do ciclo celular da linhagem CHO-XRS5 analisada pelo citômetro de fluxo Guava CytoSoft 4.2.1 com a utilização do software Environment (Guava Technologies) 24 h após o tratamento com AgNPs de 10 e 100 nm.

Ciclo Celular (24 h)																
CHO-XRS5																
Tratamento (µg/mL)	Sub G1				G1				S				G2			
	10 nm		100 nm		10 nm		100 nm		10 nm		100 nm		10 nm		100 nm	
	Média	DP (±)	Média	DP (±)	Média	DP (±)	Média	DP (±)	Média	DP (±)	Média	DP (±)	Média	DP (±)	Média	DP (±)
CN	4	2	12	5	51	2	39	6	12	2	15	2	32	2	35	3
CP	57*	11	37	26	10*	1	21	14	5*	1	13	7	28	9	30	6
0,025	5	2	20	20	50	4	32	7	13	1	16	5	32	3	34	8
0,25	6	1	16	6	48	3	35	4	13	1	14	3	33	2	35	2
1,25	5	2	11	3	46	3	38	2	12	2	16	1	37	3	36	2
2,5	4	3	12	6	48	4	37	6	13	1	16	3	35	3	36	3
5	30*	13	93*	4	24*	8	3*	2	12	4	1*	1	34	4	3*	20

(*) Diferença estatisticamente significativa quando comparada ao controle negativo (p<0,05).

CN: controle negativo; CP: controle positivo - DXR - 0,15 µg/mL

Foram realizados três experimentos independentes, sendo cada experimento realizado em duplicata. (±) DP: Desvio Padrão

Tabela 16. Valores percentuais das células nas fases subG1, G1, S e G2 do ciclo celular da linhagem CHO-XRS5 analisada pelo citômetro de fluxo Guava CytoSoft 4.2.1 com a utilização do software Environment (Guava Technologies) 72 h após o tratamento com AgNPs de 10 e 100 nm.

Ciclo Celular (72 h)																
CHO-XRS5																
Tratamento (µg/mL)	Sub G1				G1				S				G2			
	10 nm		100 nm		10 nm		100 nm		10 nm		100 nm		10 nm		100 nm	
		DP		DP		DP		DP		DP		DP		DP		DP
	Média	(±)	Média	(±)	Média	(±)	Média	(±)	Média	(±)	Média	(±)	Média	(±)	Média	(±)
CN	3	0	1	0	58	1	61	5	9	0	8	1	31	1	30	3
CP	82*	9	35*	20	1*	0	23*	8	3	1	9	0	14*	8	23	6
0,025	3	0	1	0	59	3	54	1	9	1	8	0	30	2	36	2
0,25	3	1	1	0	60	7	59	2	9	4	8	1	28	5	32	2
1,25	4	2	1	0	51	1	58	3	11	1	9	2	33	3	32	1
2,5	2	0	1	0	51	1	61	3	10	3	9	1	36	2	30	2
5	5	0	27	16	50	2	29*	5	12	2	13	5	34	3	31	7

(*) Diferença estatisticamente significativa quando comparada ao controle negativo (p<0,05).

CN: controle negativo; CP: controle positivo – DXR - 0,15 µg/mL.

Foram realizados três experimentos independentes, sendo cada experimento realizado em duplicata. (±) DP: Desvio Padrão

6. Discussão

6. DISCUSSÃO

As nanopartículas de prata (AgNPs) vêm ganhando merecido destaque principalmente devido à sua ação antimicrobiana, sendo amplamente utilizadas em inúmeros produtos como roupas esportivas, cateteres, curativos, aparelhos eletrônicos, etc. No entanto, em contrapartida às suas amplas aplicações estão os possíveis danos que elas podem causar ao meio ambiente e ao ser humano. Existem evidências que apontam para a ação dessas NPs por meio do mecanismo cavalo de tróia, no qual as partículas internalizadas se ionizam e induzem uma série de danos no ambiente intracelular (PARK et al. 2010). Todavia, os mecanismos de bioacumulação e toxicidade das AgNPs continuam a ser um desafio para a nanotoxicologia, pois o comportamento dessas partículas dentro da célula ainda é um enigma e as reações metabólicas e imunológicas resultantes de sua toxicidade não estão completamente elucidadas (ASHARANI; HANDE; VALIYAV, 2009).

A genotoxicidade das AgNPs é ainda pouco explorada quando comparada com os estudos de citotoxicidade, porém existem evidências de que essas partículas possam induzir aberrações, fusões e quebras cromossômicas, além de quebras de fita dupla do DNA (LIM; ASHARANI; HANDE, 2012). No sentido de elucidar esta questão foi realizada a comparação entre a linhagem CHO-XRS5, deficiente para o reparo de quebra de fita dupla, e a linhagem selvagem CHO-K1. Foram utilizadas AgNPs de diferentes tamanhos com baixo índice de polidispersão em solução aquosa e que contém citrato como agente estabilizador, o que confere maior uniformidade aos resultados obtidos, pois as AgNPs tendem a aglomerar pouco em solução, mantendo constantes seu diâmetro médio e a concentração com o passar do tempo (POWERS et al., 2011).

6.1. Citotoxicidade das AgNPs

Os ensaios de viabilidade são vitais na toxicologia para explicar a resposta celular a um agente tóxico. Além disso, eles fornecem informações sobre a morte celular, sobrevivência e atividades metabólicas (ASHARANI et al. 2009). Para avaliar a viabilidade das células CHO-K1 e CHO-XRS5 após a exposição por 24 h à AgNPs de 10 e 100 nm foi utilizado “Cell Proferation Kit II” (XTT). O sal de tetrazólio XTT, 2,3-bis [2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil]-2H-tetrazólio-5-carboxanilida, é amplamente utilizado em ensaios para medir a viabilidade e proliferação celular (BERRIDGE; HERST; TAN, 2005; WANG; YU; WICKLIFFE, 2010).

A viabilidade e a proliferação são baseados na capacidade das enzimas mitocondriais desidrogenase presentes nas células vivas em reduzir o XTT à um produto alaranjado, o formazan (ROEHM et al., 1991). A quantidade de formazan é medida utilizando um espectrofotômetro para calcular a viabilidade celular relativa. É amplamente aceito e difundido que esta conversão ocorre apenas em células viáveis (ZHU et al., 2004).

Os experimentos de viabilidade celular deste estudo mostraram uma clara citotoxicidade da concentração 5 µg/mL das partículas de 10 e 100 nm nas linhagens CHO-XRS5 e CHO-K1, citotoxicidade esta que já havia sido verificada por Foldbjerg (2010) nas células da linhagem A459 tratadas com AgNPs de aproximadamente 100 nm, por meio do ensaio de viabilidade baseado na metabolização do sal brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT). As concentrações de AgNPs de 10 nm necessárias para reduzir a viabilidade em 50% (IC₅₀) foram de 5,64 µg/mL nas células CHO-K1 e 4,80 µg/mL nas células CHO-XRS5, concentrações muito próximas à concentração de 4 µg/mL, que foi o valor de IC₅₀ obtido nas células da linhagem de fígado humano Chang após o tratamento com AgNPs de 5-10 nm (MEI et. al. 2011).

Os valores de IC₅₀ indicaram maior citotoxicidade das partículas de 100 nm em relação às partículas de 10 nm, sendo que o menor valor foi observado na linhagem CHO-XRS5 tratada com AgNPs de 100 nm. A diferença significativa observada entre o controle negativo e as células CHO-K1 tratadas com concentração de 2,5 µg/mL de AgNPs de 100 nm não foi considerada como padrão de exclusão deste tratamento nos testes de genotoxicidade e mutagenicidade, pois a viabilidade observada nas células tratadas com esta concentração foi de 67%. Entretanto, não foram verificadas diferenças marcantes de citotoxicidade entre as células tratadas com AgNPs de 10 e 100 nm, o que indica uma semelhança de citotoxicidade de ambas as partículas nas concentrações de massa utilizadas neste trabalho.

A citotoxicidade dose-dependente das AgNPs *in vitro*, obtidas por meio do ensaio colorimétrico XTT, verificadas neste trabalho também foi relatada por outros estudos. Sendo que ensaios de viabilidade celular com células das linhagens de fibroblasto IMR-90 e a de glioblastoma humano U251 após o tratamento com AgNPs de 6-20 nm, apontaram para uma diminuição dose dependente da porcentagem de células metabolicamente ativas (ASHARANI et al. 2009). Essa diminuição da viabilidade com o aumento da concentração das AgNPs também foi verificada por Singh e Ramarao (2012) nas linhagens de células humanas A549, A498, HepG2 e Neuro2A.

Em grande parte dos estudos com NPs são utilizados apenas ensaios de viabilidade baseados na metabolização do XTT e MTT. No entanto, existem vários fatores que podem influenciar os resultados de viabilidade celular inferidos a partir da metabolização do sal destes compostos, dentre eles podemos citar o pH ácido (JOHNO; TAKAHASHI; KITAMURA, 2010), análogos de piruvato (GANAPATHY-KANNIAPPAN et al., 2010) e nanomaterias (GORMLEY; GHANDEHARI, 2009; PARK, M et al., 2009). Os nanomateriais podem influenciar os resultados de viabilidade celular reduzindo o sal XTT e MTT por meio da indução da produção de O_2^- por parte das células, o que resulta em uma superestimativa da viabilidade celular e consequentemente uma subestimativa da citotoxicidade destes materiais (WANG; YU; WICKLIFFE, 2011).

Além disso, as AgNPs também podem agir induzindo as mitocôndrias das células, com as quais entram em contato, à produção de EROs nas células (CHAIRUANGKITTI, et al. 2013; LIU, W. et al., 2010). Durante a fosforilação oxidativa na mitocôndria, o oxigênio é reduzido à água através da adição de elétrons de forma controlada através da cadeia respiratória. Alguns desses elétrons ocasionalmente escapam da cadeia e são atraídos pelo oxigênio molecular para formar um radical extremamente reativo, o ânion superóxido (O_2^-). Se este radical não for convertido em peróxido de hidrogênio e depois reduzido em água ou hidroxila (OH $^-$), pode atuar reduzindo o sal XTT o que poderia levar à superestimação da viabilidade celular. (ASHARANI et al., 2009; BOONSTRA; POST, 2004; WANG; YU; WICKLIFFE, 2011). Assim sendo, foi realizado outro ensaio de citotoxicidade, o ensaio de sobrevivência clonogênica, para efeito de confirmação dos efeitos citotóxicos encontrados com ensaio XTT.

A eficiência clonogênica é o parâmetro de análise do ensaio de sobrevivência clonogênica utilizado para inferir a citotoxicidade de um determinado composto. O ensaio clonogênico é utilizado como um método alternativo evitando a utilização de qualquer corante indicador colorimétrico ou fluorescente, eliminando assim o risco de interações entre o corante e metabólitos celulares e entre o corante e o composto testado, o que permite uma avaliação mais direta da citotoxicidade em questão. Esta técnica foi descrita pela primeira vez por Puck e Markus (1956) e desde então, vem sendo utilizada em uma variedade de estudos com diferentes tipos de células, para detectar células que retêm a capacidade de produzir colônias após tratamentos que podem inibir a capacidade de reprodução em virtude de danos nos cromossomos, apoptose, etc (BROWN; ATTARDI, 2005).

Até o presente momento, esta é a técnica utilizada para determinar a capacidade das células de formarem colônias após serem expostas à radiação na área da pesquisa oncológica

(MAGUIRE et al., 2005; O'REILLY; MOTHERSILL, 1997). Recentemente, no entanto, o ensaio de sobrevivência clonogênica também tem sido utilizado para a sobrevivência celular após a exposição a outras classes de xenobióticos (FRANKEN et al., 2006, GLAVIANO et al., 2006).

Por meio do ensaio de sobrevivência clonogênica empregado no presente estudo, foi possível observar uma diminuição significativa ($p < 0,05$) do número de colônias entre o controle negativo e a maior concentração (5 $\mu\text{g/mL}$) na linhagem CHO-K1 tratada com AgNPs de 10 e 100 nm. O mesmo não foi observado para a linhagem CHO-XRS5 devido à grande variação no número de colônias observada entre os diferentes tratamentos em comparação com o controle negativo. Esta variação pode ser atribuída à deficiência de reparo desta linhagem, o que pode resultar no acúmulo de danos no DNA e, conseqüentemente, na incapacidade dessas células de formarem colônias. Entretanto em ambas as linhagens foi observada uma diminuição dose dependente da capacidade clonogênica o tratamento com AgNPs. Esta diminuição na capacidade clonogênica também foi verificada nas células A549, HT29 e HepG2 após o tratamento com diferentes concentrações de AgNPs de 20 e 200 nm. (KRUSZEWSKI et al. 2013).

A identificação das concentrações citotóxicas e a utilização posterior de apenas concentrações inferiores à estas nos ensaios genotóxicos é de extrema importância pois a citotoxicidade interfere nos resultados de identificação de danos no DNA. Além disso, existem evidências de que a ocorrência de danos oxidativos decorrentes da toxicidade das AgNPs tem uma relação direta com a perda da capacidade clonogênica (KRUSZEWSKI et al. 2013). Assim o estudo conjunto dos danos citotóxicos e genotóxicos das AgNPs são essenciais para a correta compreensão dos mecanismos de toxicidade dessas NPs.

6.2. Genotoxicidade das AgNPs

O ensaio cometa, também referido como ensaio de eletroforese em gel de uma única célula, é uma técnica rápida e quantitativa pela qual os danos no DNA em células eucarióticas podem ser mensuradas. Este ensaio tem sido amplamente utilizado em diversas áreas, incluindo biomonitorização humana, genotoxicologia, monitorização ecológica e como uma ferramenta para avaliar mecanismos de reparo em resposta a diferentes tipos de dano genotóxicos (COLLINS, 2004). No presente trabalho, foi verificada maior quantidade de danos genotóxicos na linhagem CHO-XRS5 em relação à linhagem CHO-K1, o que era previsto, pois a quebra de fita dupla é um dos danos genotóxicos mensurados pelo ensaio

cometa. Como a concentração de 5 µg/mL foi citotóxica nos ensaios de viabilidade celular e de sobrevivência clonogênica sua genotoxicidade não foi mensurada no ensaio cometa. O aumento significativo de danos no DNA ($p < 0,05$) observado entre o controle negativo e as concentrações de 1,25 e 2,5 µg/mL de AgNPs (10 e 100 nm) em ambas as linhagens demonstraram a capacidade de indução de danos genotóxicos pelas NPs de prata. Além disso, em ambas linhagens celulares foi observado que as diferentes concentrações de AgNPs de 10 nm induziram maior quantidade de danos no DNA do que suas homólogas maiores (100 nm).

O aumento dose-dependente dos danos genotóxicos induzidos pelas AgNPs verificados analisando-se o comprimento da cauda do cometa foram verificados por vários autores. (ASHARANI et al. 2009; FLOWER et.al. 2012; HACKENBERG et al., 2011; MEI et. al. 2010). AshaRani et al. (2009b) observaram um aumento dose-dependente da genotoxicidade nas linhagens U251 e IMR-90, sendo que a linhagem de glioblastoma U251 apresentou maior quantidade de danos no DNA do que a linhagem de fibroblastos IMR-90. Estudos com células tronco mesenquimais humanas também indicaram o aumento dose-dependente da genotoxicidade causado pela ação das AgNPs (HACKENBERG, et al., 2011).

Outros estudos em células humanas comprovaram o aumento da indução de lesões no DNA como consequência do tratamento com AgNPs, como exemplo, pode-se citar o aumento de danos genotóxicos verificado nas células Chang, linhagem de fígado humano, após o tratamento com AgNPs de 5-10 nm (MEI et. al. 2010). A capacidade de indução de danos genotóxicos por parte das AgNPs é tão expressiva que Flower et.al. (2012) verificaram que tanto um tratamento por 3 h quanto outro por apenas 5 minutos com AgNPs (40-60 nm) nas concentrações de 50 e 100 µg/mL são capazes de induzir danos no DNA em sangue periférico humano. Dessa forma, os resultados de genotoxicidade obtidos por meio desse ensaio empregado no presente estudo, além de ser corroborado pela literatura lançam luz sobre a questão da relação entre tamanho e toxicidade, mostrando que as partículas de 10 nm tendem a causar mais danos genotóxicos do que a mesma concentração em massa das suas homólogas maiores (100 nm).

O Ensaio Cometa não é utilizado para detectar mutações, mas sim lesões genômicas que, após serem processadas podem se tornar mutações. As lesões identificadas pelo ensaio cometa são passíveis de reparo, assim se torna necessária a utilização de ensaios mutagênicos como o teste do micronúcleo para averiguar quais tratamentos induzem mutações nas células. (GONTIJO; TICE, 2003) Neste sentido foi realizado o teste do micronúcleo nas células das linhagens CHO-K1 e CHO-XRS5 tratadas com AgNPs de 10 e 100 nm. O teste do MN em células binucleadas é o método mais utilizado para medir micronúcleos em culturas de células

humanas Assim, a frequência de micronúcleos nas células após determinado tratamento é um indicativo de quebras e perdas cromossômicas (FENECH, 2000; FENECH; MORLEY, 1985a, 1985b, 1986).

O aumento dose dependente do número de células com micronúcleos observados em ambas as linhagens utilizadas neste trabalho (CHO-K1 e CHO-XRS5) mostrou a atividade mutagênica das AgNPs. A linhagem CHO-XRS5 comparativamente à CHO-K1, apresentou maior número de micronúcleos em todos os tratamentos, sendo que o maior número deste indicativo de mutação cromossômica foi observado nas células da linhagem CHO-XRS5 tratadas com AgNPs de 100 nm. As NPs de 100 nm mostraram maior potencial mutagênico do que as NPs de 10 nm em todos os tratamentos em contraste com o maior potencial genotóxico das partículas de 10 nm observado no ensaio cometa.

A indução dose-dependente de quebras e perdas cromossômicas e, consequentemente, de micronúcleos pelas AgNPs foi relatada por AshaRani et al. (2009) que constatou a indução de MNs na linhagem de glioblastoma U251 e na linhagem de fibroblastos IMR-90, nas quais foi observado um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) entre o controle negativo e as diferentes concentrações (25, 50, 100, 200 e 400 $\mu\text{g/mL}$) de AgNPs de 6-20 nm.

Assim, pode-se inferir que devido à relação superfície/volume das partículas de 100 nm ser menor quando comparadas às de 10 nm, elas tendem a ser menos reativas, induzindo um menor número de danos a curto prazo. Entretanto, considerando o maior diâmetro das partículas de 100 nm, elas tendem a oferecer uma maior dificuldade para a célula em relação à sua eliminação.

A frequência de pontes nucleoplasmáticas é um indicativo da instabilidade genômica presente nas células após a exposição a determinado composto, indicando a presença de cromossomos dicêntricos que conectam os núcleos da célula (FENECH, 1997).

A inclusão do número de pontes nucleoplasmáticas como um dos parâmetros de análise do teste do micronúcleo é de extrema importância, pois fornece informação acerca dos rearranjos cromossômicos, cuja informação não pode ser obtida quando se avalia apenas o número de micronúcleos (BEESTRA et al., 2005; CROTT et al., 2001a; CROTT et al., 2001b; FENECH, 2000; FENECH, 2006; KIMURA et al., 2004; UMEGAKY; FENECH, 2000; THOMAS; UMEGAKI; FENECH, 2003).

No presente trabalho, da mesma forma como foi observado para o número de micronúcleos, houve um aumento do número de pontes nucleoplasmáticas com o aumento da concentração, sendo que as células CHO-XRS5 tratadas com AgNPs de 100 nm também

foram as que apresentaram maior número de pontes nucleoplasmáticas. Conseqüentemente, pode-se inferir a partir destes dados que as NPs de 100 nm, além de induzirem um maior número de micronúcleos, também provocam maior número de rearranjos cromossômicos do que as AgNPs de 10 nm. Apesar de ser um parâmetro extremamente informativo, a frequência de pontes nucleoplasmáticas não tem sido considerada nos trabalhos que avaliam o potencial mutagênico das AgNPs (ASHARANI et al. 2009; KIM et al. 2011; NYMARK et al. 2012). Assim, a análise *in vitro* da ação das AgNPs na formação pontes nucleoplásticas apresentada neste trabalho é pioneira e lança luz sobre a questão da toxicidade dessas NPs.

A avaliação do índice de divisão nuclear (IDN) no teste do micronúcleo fornece informações sobre as propriedades citostáticas e citotóxicas do agente a ser examinado, que são relevantes para a avaliação de toxicidade deste agente (FENECH, 2007). Os resultados do presente estudo mostraram que os valores de IDN apresentaram padrão semelhante à frequência de MN e à frequência de PN, pois foram observados valores de IDN menores na linhagem CHO-XRS5 quando comparada com a linhagem CHO-K1 e as células que apresentaram o menor valor de IDN foram as células da linhagem mutante CHO-XRS5 tratadas com AgNPS de 100 nm.

A diminuição nos valores de IDN após o tratamento com AgNPs também foi relatada em análises genotóxicas de plantas (KUMARI et al. 2012; PANDA et al. 2011; PATLOLLA et al. 2012), entretanto este parâmetro não tem sido considerado em análise genotóxicas e citotóxicas em linhagens celulares (ASHARANI et al. 2009; KIM et al. 2011; NYMARK et al. 2012), o que dá especial relevância aos dados de IDN apresentados neste trabalho.

Por ser tão informativo, o teste do micronúcleo é uma ferramenta muito utilizada e que evoluiu de forma muito rápida no campo da Genética Toxicológica. (SALVADORI; RIBEIRO; FENECH, 2003). Entretanto, apesar de extremamente informativo, o teste do micronúcleo não informa as consequências da indução de danos cromossômicos, o mesmo ocorre com o ensaio de viabilidade e o ensaio cometa previamente descritos. Neste sentido, foi realizado o ensaio da cinética do ciclo celular por citometria de fluxo para se verificar os efeitos celulares posteriores aos danos induzidos pelas AgNPs.

O ciclo celular na sua forma mais simples, é dividido em 4 fases, além da fase de quiescência, também denominada de G0. A fase G1 se caracteriza pela fase em que a célula se prepara para sintetizar o seu DNA. Após esta fase, segue a etapa em que a célula efetivamente sintetiza o seu DNA, denominada fase S. Após a fase S, inicia-se a fase G2, na qual a célula se prepara para a fase mitótica. A fim de que a célula mantenha a integridade do material genético que está sendo duplicado, dois pontos de checagem são de vital importância durante

o ciclo celular. Estes dois pontos ocorrem no final da fase G1 (ponto de controle G1/S) e no final da fase G2 (ponto de controle G2/M).

O primeiro ocorre antes da síntese de DNA e depende dos mecanismos que monitoram a integridade do DNA. Assim, caso existam danos detectáveis no DNA, o processo de divisão celular não passará deste ponto até que o dano seja reparado, ou no caso da impossibilidade de reparo, o processo de mitose é abandonado. O segundo ponto é menos entendido em eucariotos, mas ocorre depois da duplicação do DNA e tem como função monitorar a duplicação completa e fidedigna do genoma (PINTO; FELZENSWALB, 2003). As células que possuem DNA fragmentado sofrerão um acúmulo em subG1, sendo que essa fase é considerada um indicativo de apoptose (ASHARANI et al., 2009).

Assim, células danificadas tendem a sofrer bloqueios no ciclo celular e a população de células se acumulam em G1, na fase S ou no intervalo G2/M, sendo que as células com danos irreversíveis sofrem apoptose, dando origem à um acúmulo de células na fase subG1 (ASHARANI et al., 2009). Entretanto, no presente estudo não foi verificado acúmulo de células nas fases G1, S ou G2 decorrente do tratamento com AgNPs, sendo que o acúmulo de células na fase G2/M devido à ação dessas NPs é descrito na literatura (ASHARANI et al., 2009; KANG et al., 2012; LEE et al., 2011). Por outro lado, foi observado um aumento da população de células na fase subG1 em ambas as linhagens (CHO-K1 e CHO-XRS5) tratadas com a concentração mais alta de AgNPs (5 µg/mL), sendo um indicativo da presença de células apoptóticas. Confirmando assim, a citotoxicidade deste tratamento, a qual também foi observada no ensaio de viabilidade celular (XTT) e no Ensaio de Sobrevivência Clonogênica.

Mais especificamente, esse aumento da população de células em subG1 ocorreu com maior intensidade nas células tratadas com AgNPs de 10 nm logo após o tratamento (0 h) e nas células tratadas com AgNPs de 100 nm 24 e 72 h após o tratamento. Estes dados reforçam os resultados do teste do micronúcleo apresentados neste trabalho, onde foi observado maior número de micronúcleos e pontes nucleoplasmáticas e menor valor de IDN nas células tratadas com AgNPs de 100 nm. Assim, o aumento de células em subG1 após 24 e 72 h de recuperação do tratamento provavelmente está relacionado com o aumento da frequência de micronúcleos e pontes nucleoplasmáticas.

Este aumento da população de células na fase subG1 decorrente do tratamento com as AgNPs é corroborado por relatos da literatura nas linhagens celulares RAW 264.7 e A549 (CHAIRUANGKITTI et al., 2013; PARK, E et al., 2010). Na análise da dinâmica do ciclo celular realizada com a linhagem A549 foi observado um aumento dose dependente da população de células em subG1 como também um aumento significativo ($p < 0,05$) de células

nesta fase com o aumento do tempo de exposição à AgNPs de aproximadamente 100 nm (CHAIRUANGKITTI et al., 2013). Enquanto na análise do ciclo celular utilizando a linhagem RAW 264.7 foi observado um aumento da população de células em subG1 apenas na maior concentração utilizada (1,6 ppm) de AgNPs de aproximadamente 150 nm (PARK, E et al. 2010).

Os resultados do ensaio da cinética do ciclo celular permitiram a realização de uma inter-relação mais clara entre os dados apresentados pelo teste do micronúcleo e pelo ensaio cometa além de apontar para a citotoxicidade da maior concentração utilizada (5 µg/mL), o que é concordante com os dados do ensaio de viabilidade celular (XTT) e sobrevivência clonogênica levantados neste trabalho. Entretanto, para a completa compreensão dos dados relativos à toxicidade dessas AgNPs - apresentados neste trabalho e na literatura até o presente momento torna-se necessária a elucidação dos mecanismos de aglomeração, de internalização e posterior redistribuição destas partículas no ambiente celular (BERGELAND et al., 2001; ERRINGTON et al. 2010; SUMMERS et al., 2011). Neste sentido ainda faz-se necessária uma análise das partículas, utilizadas no presente trabalho, pela microscopia de transmissão para a validação dos tamanhos nominais (10 e 100 nm) descritos pelo fabricante.

A questão sobre a influência do tamanho na toxicidade das AgNPs é de extrema importância para o entendimento dos mecanismos de ação dessas NPs, sendo que estudos recentes tem sido realizados no intuito de elucidar essa questão (GAISER et al., 2012; GORTH; RAND; WEBSTER, 2011; JOHNSTON et al., 2010; KIM et al., 2011; LIU, H. et al. 2010; ORDZHONIKIDZE et al., 2009; PANDA et al., 2011; PARK, M et al., 2011; POWERS et al., 2011; SINGH; RAMARAO, 2012; ZHANG et al., 2009). Assim, a proposta deste trabalho de realizar uma análise comparativa da toxicidade de AgNPs de diferentes tamanhos (10 e 100 nm) é atual e relevante para os estudos em nanotoxicologia.

Apesar de contrariar a hipótese inicialmente levantada de que as AgNPs de 10 nm são mais cito e genotóxicas que suas homólogas de 100 nm, houve uma harmonia entre os resultados dos diferentes ensaios utilizados no presente trabalho e os resultados obtidos são suportados por dados da literatura (GORTH; RAND; WEBSTER, 2011, POWERS et al. 2011). Ademais, existem evidências de que ocorra uma captação preferencial por parte das células de partículas de 20-100 nm em detrimento de suas homólogas menores, o que vem de encontro os dados apresentados neste trabalho (BROWN; GOLDSTEIN, 1979; CONNER; SCHMID, 2003; ZHANG et al., 2009). Este estudo também contribui para o entendimento dos mecanismos de toxicidade das AgNPs no sentido de conferir respaldo para a atuação das AgNPs na indução de quebras duplas, devido à maior toxicidade observada na

linhagem CHO-XRS5 quando comparada com a linhagem CHO-K1. Além disso, a análise de pontes nucleoplasmáticas realizada no presente trabalho contribui de forma pioneira para os estudos toxicológicos com AgNPs. Outro ponto que deve ser ressaltado é que as partículas utilizadas foram adquiridas de uma fonte comercial, o que torna possível que esses nanomateriais possam ser usados por outros estudos em busca de padronização e harmonização dos resultados apresentados na literatura.

Todavia, estudos futuros devem ser realizados no intuito de mensurar o estresse oxidativo, verificar a indução de morte celular (apoptose), investigar de forma detalhada as alterações no DNA e estudar a dinâmica dos mecanismos de reparo do DNA após o tratamento com AgNPs de diferentes diâmetros. Assim, os mecanismo de ação a curto, médio e longo prazo dessas NPs serão mais bem compreendidos, o que culminará com a padronização na utilização das AgNPs evitando que os inúmeros benefícios proporcionados pela utilização dessas sejam ofuscados pela ameaça à saúde humana e ao meio ambiente que atualmente elas representam.

7. Conclusões

7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos e discutidos sobre o tratamento das células CHO-K1 e CHO-XRS5 com as AgNPs de 10 e 100 nm, possibilitaram as seguintes conclusões:

1. As AgNPs (10 e 100 nm) são citotóxicas na concentração de 5 µg/mL e possuem uma genotoxicidade dose dependente nas concentrações de 0,025 a 2,5 µg/mL.
2. Devido à deficiência de reparo de quebras de fita dupla, a linhagem CHO-XRS5 apresenta menor tolerância aos danos causados pela exposição às AgNPs, comprovando a ação dessas partículas na indução de quebras de fita dupla
3. A indução de danos genotóxicos e mutagênicos pelas AgNPs, observados respectivamente no ensaio cometa e no teste do micronúcleo, são dose dependentes.
4. O efeito citotóxico causado pelas AgNPs pode ser constatado e mensurado por meio do acúmulo de células em subG1 (indicativo de apoptose).
5. As partículas de 100 nm são mais citotóxicas e genotóxicas do que suas homólogas menores (10 nm). Esta diferença de toxicidade foi claramente evidenciada por meio das metodologias utilizadas neste trabalho.

Referências

REFERÊNCIAS

- AARON C. S.; STANKOWSKI, L. F. Comparison of the AS52/XPRT and the CHO/HPRT assays: Evaluation of 6 drug candidates, **Mutation Research**, Amsterdam, v. 223, p. 121–128, 1989.
- AHAMED, M.; KARNS, M.; GOODSON, M.; ROWE, J.; HUSSAIN, S. M.; SCHLAGER, J. J.; HONG, Y. DNA damage response to different surface chemistry of silver nanoparticles in mammalian cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, .Amsterdam, v. 233, p. 404-410, 2008.
- ANTUNES, L.M.G.; ARAÚJO, M.C.P.; DIAS, F.L.; TAKAHASHI, C.S. Modulatory effects of curcumin on the chromosomal damage induced by doxorubicin in Chinese hamster ovary cells. **Teratogenesis Carcinogenesis Mutagenesis**, London, v. 19, p.1-8, 1999.
- APPENZELLER, T. The man who dared to think small. **Science**, Washington, v. 254, p. 1300, 1991.
- ARORA, S.; JAIN, J.; RAJWADE, J. M.; PAKNIKAR, K. M. Interactions of silver nanoparticles with primary mouse fibroblasts and liver cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, Amsterdam, v. 236, n. 8, p. 310-318, 2009.
- ASHARANI, P. V.; WU, Y. L.; GONG, Z. Y.; VALIYAVEETIL, S. Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models. **Nanotechnology**, Bristol, v. 19, n.25, 2008.
- ASHARANI, P. V.; HANDE, M. P.; VALIYAV, S. Antiproliferative activity of silver nanoparticles. **BMC Cell Biology**, London, v.10, n. 65, 2009.
- ASHARANI, P. V., MUN, G.L.K., HANDE, M.P., VALIYAVEETIL, S., Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. **ACS Nano**, New York, v.3, n.2, p.279-290, 2009
- ATIYEH, B. S.; COSTAGLIOLA, M.; HAYEK, S. N.; DIBO, S. A. Effect of silver on burn wound infection control and healing: review of the literature, **Burns**, Amsterdam, v.33, p.139-148, 2007.
- AUFFAN, M.; ROSE, J.; WIESNER, M. R.; BOTTERO, J. Y. Chemical stability of metallic nanoparticles: a parameter controlling their potential cellular toxicity in vitro. **Environmental Pollution**, Amsterdam, v.157, n. 4, p.1127-1133, 2009.
- BAE, J.; GLOGOWSKI, E.; GUPTA, S.; CHEN, W.; EMRICK, T.; RUSSELL, T. P. Effect of nanoparticles on the electrohydrodynamic instabilities of polymer/nanoparticle thin films. **Macromolecules**, New York, v. 41, p. 2722–2726, 2008.
- BEETSTRA, S.; SALISBURY, C.; TURNER, J.; ALTREE, M.; MCKINNON, R.; SUTHERS, G.; FENECH, M. Lymphocytes of BRCA1 and BRCA2 germ-line mutation carriers, with or without breast cancer, are not abnormally sensitive to the chromosome damaging effect of moderate folate deficiency, **Carcinogenesis**, Oxford, 27, p. 517–524, 2005.

- BERANEK, D.T. Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 231, p. 11–30, 1990.
- BERGELAND, T.; WIDERBERG, J.; BAKKE, O.; NORDENG, T. W. Mitotic partitioning of endosomes and lysosomes. **Current Biology**, London, v. 11, p.644–651, 2001.
- BERRIDGE, M.V.; HERST, P.M.; TAN, A. S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. **Biotechnology Annual Review**, Amsterdam, v.11, p.127–152, 2005.
- BOONSTRA, J.; POST, J. A. Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells. **Gene**, Amsterdam, v. 337, p.1–13, 2004.
- BOSANAC, L.; AABO, T.; BENDIX, P. M.; ODDERSHEDE, L. B. Efficient optical trapping and visualization of silver nanoparticles, **Nano Letters**, Washington, v. 8, p. 1486–1491, 2008.
- BROWN, J. M.; ATTARDI, L. D. The role of apoptosis in cancer development and treatment response. **Nature Reviews Cancer**, Philadelphia, v.5, p.231–237, 2005.
- BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. Receptor-mediated endocytosis: insights from the lipoprotein receptor system. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v.76, p. 3330–3337, 1979.
- BRYANT, P. E. Enzymatic restriction of mammalian cell DNA using PvuII and Bam HI: evidence for the double-strand break origin of chromosomal aberrations. **International Journal of Radiation Biology**, London, v.46, p. 57–65, 1984.
- CARTER, S. B., Effects of cytochalasins on mammalian cells. **Nature**, Philadelphia, v.213, p.261–264, 1967.
- CHAIRUANGKITTI, P.; LAWANPRASERT, S.; ROYTRAKUL, S.; AUEVIRIYAVIT, S.; PHUMMIRATCH, D.; KULTHONG, K.; CHANVORACHOTE, P.; MANIRATANACHOTE, R. Silver nanoparticles induce toxicity in A549 cells via ROS-dependent and ROS-independent pathways. **Toxicology in Vitro**, Amsterdam, v. 27, p. 330–338, 2013.
- CHEN, J.; MCLELLAN J. M.; SIEKKINEN, A.; XIONG, Y.; LI, Z-Y.; XIA, Y. Facile synthesis of gold–silver nanocages with controllable pores on the surface. **Journal of American Chemical Society**, Washington, v. 128, p.14776–14777, 2006.
- CHEN, J.; SAEKI, F.; WILEY, B. J.; CANG, H.; COBB, M. J.; Li Z. Y; AU, L.; ZHANG, H.; KIMMEY, M. B.; LI, X.; XIA, Y. Gold nanocages: bioconjugation and their potential use as optical imaging contrast agents. **Nano Letters**, Washington, v. 5, p. 473–477, 2005.
- CHOI, O.; HU, Z. Q. Size dependent and reactive oxygen species related nanosilver toxicity to nitrifying bacteria. **Environmental Science and Technology**, Washington, v. 42, n. 12, p. 4583–4588, 2008.

- CHOI, O.; YU, C. P.; FERNÁNDEZ, E. G.; HU, Z. Interactions of nanosilver with *Escherichia coli* cells in planktonic and biofilm cultures, **Water Research**, London, v. 44, n. 20, p. 6095-6103, 2010.
- COLLINS, A.R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. **Molecular Biotechnology**, London, v. 26, p.249–261, 2004.
- CONNER, S. D.; SCHMID, S. L. Regulated portals of entry into the cell. **Nature**, Philadelphia, v. 422, p. 37–44, 2003.
- COSTA, N.D; BRYANT, P. E. Repair of DNA single-strand and double-strand breaks in the Chinese Hamster xrs-5 mutant cell line as determined by DNA in winding. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 194, p. 93-99, 1988.
- CROTT, J. W.; MASHIYAMA, S.T.; AMES, B. N.; FENECH, M. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism does not alter folic acid deficiency-induced uracil incorporation into primary human lymphocyte DNA in vitro. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 22, p. 1019–1025, 2001a.
- _____. Folic acid deficiency increases chromosome breakage and rearrangement, gene amplification and DNA-uracil content in human lymphocytes in vitro: effect of MTHFR C677T polymorphism. **Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention**, Philadelphia, v. 10, p. 1089–1096, 2001b.
- DARLINGTON, T. K.; NEIGH, A. M.; SPENCER, M. T.; NGUYEN, O. T.; OLDENBURG, S. J. Nanoparticle characteristics affecting environmental fate and transport through soil. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Oxford, v. 28, n. 6, p. 1191-1199, 2009.
- DARROUDI, F; NATARAJAN, A. T. Cytogenetical characterization of Chinese Hamster ovary K-ray-sensitive mutant cell xrs-5 and xrs-6. I. Induction of chromosomal aberration by X-irradiation and its modulation with 3-aminobenzamide and caffeine. **Mutation Research**, Amsterdam, v.177, p. 133-148, 1987.
- _____. Cytogenetical characterization of Chinese Hamster ovary X-ray-sensitive mutant cells xrs-5 and xrs-6.III. Induction of cell killing. chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges by bleomycin, mono-and bi-functional alkylating agents. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 212, p. 123-135, 1989.
- DOBSON, J. Gene therapy progress and prospects: magnetic nanoparticle-based gene delivery. **Gene Therapy**, Philadelphia, v. 13, p. 283-287, 2006.
- DORJNAMJIN, D.; ARIUNAA, M.; SHIM, Y.K. Synthesis of silver nanoparticles using hydroxyl functionalized ionic liquids and their antimicrobial activity. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 9, n. 5, 807-819, 2008.
- DREXLER, K. E. **Engines of Creation: The Coming Era of Nanotechnology**. New York. Knopf Doubleday Publishing Group, 1986.

_____. **Nanosystems: Molecular Machinery, Manufacturing, and Computatin.** Oxford, John Wiley & Sons, 1992.

EASTMOND, D. A.; TUCKER, J. D. Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochores antibody. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, Oxford, v. 13, n. 1, p. 34-43, 1989.

ELECHIGUERRA, J. L.; BURT J. L.; MORONES, J. R.; CAMACHO-BRAGADO, A.; GAO, X.; LARA, H. H.; YACAMAN, M. J. Interaction of silver nanoparticles with HIV-1. **Journal of Nanobiotechnology**, London, v. 3, p. 6, 2005.

ERRINGTON, R. J.; BROWN M. R.; SILVESTRE, O. F.; NJOH, K. L.; CHAPPELL, S. C. ; KHAN, I. A.; REES, P.; WILKS, S. P.; SMITH, P. J.; SUMMERS, H. D. Single cell nanoparticle tracking to model cell cycle dynamics and compartmental inheritance. **Cell Cycle**, Austin, v. 9, p. 121–130, 2010.

FENECH, M. The advantages and disadvantages of the cytokineses-block micronucleus method. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 392, p. 11-18, 1997.

_____. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 455, p. 81–95, 2000.

_____. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a “cytome” assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death, **Mutation Research**, Amsterdam, v. 600, p. 58–66, 2006.

_____. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature Protocols**, Philadelphia, v. 2, n.5, p.1084-104, 2007.

FENECH, M.; MORLEY, A. A. Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay. **Cytobios**. v. 43, p. 233–246, 1985a.

_____. Measurement of micronuclei in lymphocytes. **Mutation Research**, Amsterdam, v.147, p. 29–36, 1985b.

_____. Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of in vivo ageing and low-dose x-irradiation. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 161, p. 193–198, 1986.

FLOWER, N. A.L.; BRABU, B.; REVATHY, M.; GOPALAKRISHNAN, C.; RAJA S.V.K.; MURUGAN, S. S.; KUMARAVEL, T. S. Characterization of synthesized silver nanoparticles and assessment of its genotoxicity potentials using the alkaline comet assay. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 742, p. 61–65, 2012.

FOLDBJERG, R.; DANG, D. A.; AUTRUP. H. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in the human lung cancer cell line, A549. **Archives of Toxicology**, New York, v. 85, n. 7, p. 743-750, 2010.

FRANKEN, N. A. P.; RODERMOND, H. M.; STAP, J.; HAVEMAN, J.; VAN BREE, C. Clonogenic assay of cells *in vitro*. **Nature Protocols**, Philadelphia, v. 1, p. 2315–2319, 2006.

- FURNO, F., MORLEY, K. S., WONG, B., SHARP, B. L., ARNOLD, P. L., HOWDLE, S. M., BAYSTON, R.; BROWN, P. D.; WINSHIP, P. D.; REID, H. J. Silver nanoparticles and polymeric medical devices: a new approach to prevention of infection? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v. 54, p. 1019-1024, 2004.
- GAISER, B. K.; FERNANDES, T. F.; JEPSON, M. A.; LEAD, J. R.; TYLER, C. H.; BAALOUSHA, M.; BISWAS, A.; BRITTON, G. J.; COLES, P. A.; JOHNSTON, B. D.; JUANAM, Y.; ROSENKRANZ, P.; SCOWN, T. M.; STONE, V. Interspecies comparisons on the uptake and toxicity of silver and cerium dioxide nanoparticles. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Oxford, v. 31, p. 144 – 154, 2012.
- GANAPATHY-KANNIAPPAN, S.; GESCHWIND, J. F. H.; KUNJITHAPATHAM, R., BUIJS, M., SYED, L.H., RAO, P.P., OTA, S., VALI, M. The pyruvic acid analog 3-bromopyruvate interferes with the tetrazolium reagent MTS in the evaluation of cytotoxicity. **Assay and Drug Development Technologies**, New Rochelle, v. 8, n. 2, p. 258–262, 2010.
- GEISER, M., ROTHEN-RUTISHAUSER B., KAPP, N., SCHURCH, S., KREYLING, W., SCHULZ H., KREYLING, W; SCHULZ, H; SEMMLER, M; IM HOF, V; HEYDER, J; GEHR P. Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells. **Environmental Health Perspectives**, Durham, v. 113, p. 1555–1560, 2005.
- GEWIRTZ, D. A. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. **Biochemical Pharmacology**, Philadelphia, v. 57, p. 727-41, 1999.
- GIVAN, A. L. Flow Cytometry: First Principles. 2nd Ed. Oxford, **John Wiley & Sons Ltd**, 2001.
- GLAVIANO, A.; NAYAK, V.; CABUY, E.; BAIRD, D.M.; YIN, Z.; NEWSON, R.; LADON, D.; RUBIO, M. A.; SLIJEPCEVIC, P.; LING, F.; MOTHERSILL, C.; CASE, C.P. Effects of hTERT on metal ion-induced genomic instability. **Oncogene**, Philadelphia, v. 25, p. 3424–3435, 2006.
- GONTIJO, C. M. M. A., TICE, R. Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo de células individualizadas. In: RIBEIRO, L. R., SALVADORI, D. M. F., MARQUES, E. K. **Mutagênese ambiental**, Canoas: Ed. ULBRA, 2003, p 247-280.
- GORMLEY, A.J., GHANDEHARI, H. Evaluation of Toxicity of Nanostructures in Biological Systems. In: Sahu, S.C.C., Daniel, A. (Eds.), **Nanotoxicity chichester**. Oxford, John Wiley & Sons Ltd, 2009, p. 115–159.
- GORTH, J. D.; RAND, D. M.; WEBSTER, T. J. Silver nanoparticle toxicity in *Drosophila*: size does matter. **International Journal of Nanomedicine**, Manchester, v. 6, p.343–350, 2011.
- GRANATIER, J.; URBAN, M.; SADLEJ, A. J. Van der Waals complexes of Cu, Ag, and Au with hydrogen sulfide. The bonding character. **Journal of Physical Chemistry A**, Washington, v. 111, n. 50, p.13238-13244, 2007

- HACKENBERG, S.; SCHERZED, A.; KESSLER, M.; HUMMEL, S.; TECHNAU, A.; FROELICH, K.; GINZKEY, C.; KOEHLER, C.; HAGEN, R.; KLEINSASSER, N. Silver nanoparticles: Evaluation of DNA damage, toxicity and functional impairment in human mesenchymal stem cells. **Toxicology Letters**, Philadelphia, v. 201, p. 27–33, 2011.
- HASSELLOV, M.; READMAN, J. W.; RANVILLE, J. F.; TIEDE, K. Nanoparticle analysis and characterization methodologies in environmental risk assessment of engineered nanoparticles. **Ecotoxicology**, London, v. 17, n.5, p.344-361, 2008.
- HEDDLE, J. A. Measurement of Chromosomal Breakage in Cultured Cells by the Micronucleus Technique. In: Evans, H. J., and Lloyd, D.C., (Eds.) **Mutation-Induced Chromosome to Man**, Edinburg, Edinburg University Press, p. 325-330, 1976.
- HENDERSON, M. A. Relationship of O₂ photodesorption in photooxidation of acetone on TiO₂. **The Journal of Physical Chemistry C**, Washington, v.112, p.11433–11440, 2008.
- HUSSAIN, S. M.; HESS, K. L.; GEARHART, J. M.; GEISS, K. T.; SCHLAGER, J. J. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. **Toxicology in Vitro**, London, v.19, n.7, p. 975–983, 2005.
- JAIN, P.; PRADEEP, T. Potential of silver nanoparticle-coated polyurethane foam as an antibacterial water filter. **Biotechnology and Bioengineering**, Oxford, v. 90, n. 1, p. 59–63, 2005.
- JEGGO, P. A. X-ray mutants of Chinese Hamster ovary cell line: Radio-sensitivity of DNA Synthesis. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 145, p. 171-176, 1985.
- JIANG, J.; OBERDÖRSTER, G.; BISWAS, P. Characterization of size, surface charge and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. **Journal of Nanoparticle Research**, London, v.11, n.1, p.77-89, 2009.
- JIN, X.; LI, M.; WANG, J.; MARAMBIO-JONES, C.; PENG, F.; HUANG, X.; DAMOISEAUX, R.; HOEK, E. M. High-throughput screening of silver nanoparticle stability and bacterial inactivation in aquatic media: influence of specific ions. **Environmental Science & Technology**, Washington, v. 19, p. 7321-7328, 2010.
- JOHNO, H.; TAKAHASHI, S.; KITAMURA, M. Influences of acidic conditions on formatzan assay: a cautionary note. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, London, v. 162, n. 6, p. 1529–1535, 2010.
- JOHNSTON, H. J.; HUTCHISON, G.; CHRISTENSEN, F.M.; PETERS, S.; HANKIN, S.; STONE, V. A review of the in vivo and in vitro toxicity of silver and gold particles: particle attributes and biological mechanisms responsible for the observed toxicity. **Critical Reviews in Toxicology**, London, v. 40, p. 328–346, 2010.
- KANG, Y.S.; RISBUD, S.; RABOLT, J. F.; STROEVE, P. Synthesis and characterization of nanometer-size Fe₃O₄ and g-Fe₂O₃ Particles. **Chemistry of Materials**, Washington, v. 8, p. 2209-11,1996.

- KANG S. J., LEE Y. J., LEE E. K., KWAK M. K. Silver nanoparticles-mediated G2/M cycle arrest of renal epithelial cells is associated with NRF2-GSH signaling. **Toxicology Letters**, Philadelphia, v.211, n.3, p.334-41, 2012.
- KARLSSON H. L.; CRONHOLM, P.; GUSTAFSSON, J.; MOLLER, L. Copper oxide nanoparticles are highly toxic: a comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes. **Chemical Research in Toxicology**, Washington, v. 21, p. 1726–32, 2008.
- KATO, H.; NAKAMURA, A.; TAKAHASHI, K.; KINUGASA, S. Size effect on photochemical properties of colloidal C60 particles in water. **Physical Chemistry Chemical Physics**, London, v.11, p. 4946–4948, 2009a.
- KATO, H.; SUZUKI, M.; FUJITA, K.; HORIE, M.; ENDOH, S.; YOSHIDA, Y.; IWAHASHI, H.; TAKAHASHI, K.; NAKAMURA, A.; KINUGASA, S. Reliable size determination of nanoparticles using dynamic light scattering method for in vitro toxicology assessment. **Toxicology in Vitro**, Philadelphia, v. 23, p. 927–934, 2009b.
- KEMP, L. M.; JEGGO, P. A. Radiation-induced chromosome damage in X-ray-sensitive mutants (xrs) of the chinese Hamster ovary cell line. **Mutation Research**, Amsterdam, v.166, p. 255-263, 1986.
- KHLEBTSOV, N. G.; DYKMAN, L. A. Optical properties and biomedical applications of plasmonic nanoparticles. **Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer**, Philadelphia, v. 111, n. 1, p.1–35, 2010.
- KIM, H. R.; KIM, M. J.; LEE, S. Y.; OH, S. M.; CHUNG, K. H. Genotoxic effects of silver nanoparticles stimulated by oxidative stress in human normal bronchial epithelial (BEAS-2B) cells. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 726, n. 2, p. 129–135, 2011.
- KIMURA, M.; UMEGAKI, K.; HIGUCHI, M.; THOMAS, P.; FENECH, M. MTHFR C677T polymorphism, folic acid and riboflavin are important determinants of genome stability in cultured human lymphocytes. **Journal of Nutrition**, Rockville Pike, v. 134, p. 48–56, 2004.
- KLAINE, S.J.; ALVAREZ, P. J.; BATLEY, G. E.; FERNANDES, T. F.; HANDY, R. D.; LYON, D. Y.; MAHENDRA, S.; MCLAUGHLIN, M. J.; LEAD, J. R. Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Oxford, v. 9, p. 1825-1851, 2008.
- KLAUDE, M.; ERIKSSON, S.; NYGREN, J.; AHNSTRÖM, G. The comet assay: mechanisms and technical considerations. **Mutation Research/DNA Repair**, Amsterdam, v. 363, p. 89-96, 1996.
- KRUG, H. F.; WICK, P. Nanotoxicology: An Interdisciplinary Challenge. **Angewandte Chemie International Edition**, Oxford, v. 50, p. 2 – 2, 2011.
- KRUSZEWSKI, M.; GRADZKA, I.; BARTŁOMIEJCZYK, T.; CHWASTOWSKA, J.; SOMMER, S.; GRZELAK, A.; ZUBEREK, M.; LANKOFF, A.; DUSINSKA, M.; WOJEWÓDZKA, M. Oxidative DNA damage corresponds to the long term survival of human cells treated with silver nanoparticles. **Toxicology Letters**, Philadelphia, v. 219, p. 151-159, 2013.

- KUMARI, M.; ERNEST, V.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N. In vivo nanotoxicity assays in plant models. **Methods in Molecular Biology**, London, v. 926, p.399-410. 2012.
- LANSDOWN A. B. Silver in health care: antimicrobial effects and safety in use. **Current Problems in Dermatology**, Basel, v. 33, p. 17-34, 2006.
- LEE, H. J.; YEO, S. Y.; JEONG, S. H. Antibacterial effect of nanosized silver colloidal solution on textile fabrics. **Journal of Materials Science**, London, v. 38, n. 10, p. 2199–2204, 2003.
- LEE, Y. S.; KIM, D. W.; LEE, Y. H.; OH, J. H.; YOON, S.; CHOI, M. S.; LEE, S. K.; KIM, J. W.; LEE, K.; SONG, C. W. Silver nanoparticles induce apoptosis and G2/M arrest via PKC ζ -dependent signaling in A549 lung cells. **Archives of Toxicology**, London, v. 85, n.12, p.1529-1540, 2011.
- LI, C.; SHUFORD, K. L.; CHEN, M.; LEE, E. J.; CHO, S. O. A facile polyol route to uniform gold octahedra with tailorable size and their optical properties. **ACS NANO**, Washington, v.2, p.1760–9, 2008.
- LIAU, W; MCNUTT, A. M.; ZHU, W. G. The comet assay: A sensitive method for detecting DNA damage in individual cells, **Methods**, Philadelphia, v.48, p.46–53, 2009.
- LIM, H. K.; ASHARANI, P. V.; HANDE M. P. enhanced genotoxicity of silver nanoparticles in dna repair deficient mammalian cells. **Frontiers in Genetics**, Lausanne, v.3, p.104, 2012.
- LIMBACH, L. K.; WICK, P.; MANSER, P.; GRASS, R. N.; BRUININK, A.; STARK, W. J. Exposure of engineered nanoparticles to human lung epithelial cells: influence of chemical composition and catalytic activity on oxidative stress. **Environmental Science & Technology**, Washington, v. 41, n.11, p. 4158–4163, 2007.
- LIU, H. L. S.; DAI, A.; FU, K. Y.; HSU, S. H. Antibacterial properties of silver nanoparticles in three different sizes and their nanocomposites with a new waterborne polyurethane. **International Journal of Nanomedicine**, Manchester, v.5, p. 1018-1028, 2010.
- LIU, M.; GUYOT-SIONNEST, P. Mechanism of silver(I)-assisted growth of gold nanorods and bipyramids. **The Journal of Physical Chemistry B**, Washington, v. 109, p. 22192–200, 2005.
- LIU, J. Y.; HURT, R. H. Ion release kinetics and particle persistence in aqueous nano-silver colloids. **Environmental Science and Technology**, Washington, v. 44, n. 6, p. 2169-2175, 2010.
- LIU, W.; WU, Y.; WANG, C.; LI, H. C.; WANG, T.; LIAO, C. Y.; CUI, L.; ZHOU, Q. F.; YAN, B.; JIANG, G. B. Impact of silver nanoparticles on human cells: Effect of particle size. **Nanotoxicology**, London, v. 4, n. 3, p. 319-330, 2010.
- LYON, T. D.; PATRIARCA, M.; HOWATSON, G.; FLEMING, P. J.; BLAIR, P. S.; FELL, G. S. Age dependence of potentially toxic elements (Sb, Cd, Pb, Ag) in human liver tissue

from paediatric subjects. **Journal of Environmental Monitoring**, London, v. 4, p. 1034–1039, 2002.

MAGUIRE, P.; MOTHERSILL, C.; SEYMOUR, C.; LYNNG, F. M. Medium from irradiated cells induces dose-dependent mitochondrial changes and BCL2 responses in unirradiated human keratinocytes. **Radiation Research**, New Orleans, v. 163, n. 384–390, 2005.

MAILLARD, J. Y.; HARTEMANN P. Silver as an antimicrobial: Facts and gaps in knowledge. **Critical Reviews in Microbiology**, London, p. 1-11, 2012.

MATTER, B.; SCHIMID, W. Treinimon-induced chromosome damage in bone-marrow cells of six mammalian species evaluates by the micronucleus test. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 12, p. 217-225, 1971.

MEI, J. P.; KANG, K. A.; LEE, I. K.; KIM, H. S.; KIM, S.; CHOI, J. Y.; CHOI, J.; HYUN J. W. Silver nanoparticles induce oxidative cell damage in human liver cells through inhibition of reduced glutathione and induction of mitochondria-involved apoptosis. **Toxicology Letters**, Philadelphia, v. 201, p. 92-100, 2011.

MODY, V. V.; NOUNOU, M. I.; BIKRAM, M. Novel nanomedicine-based MRI contrast agents for gynecological malignancies. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Philadelphia, v. 61, p. 795-807, 2009.

MODY, V. V.; SIWALE, R.; SINGH, A.; MODY, H. R. Introduction to metallic nanoparticles. **Journal of Pharmacy and Bioallied Science**, Mumbai, v. 2, p. 282-9, 2010.

MORONES, J. R.; ELECHIGUERRA, J. L.; CAMACHO, A.; HOLT, K.; KOURI, J. B.; RAMIREZ, J. T.; YACAMAN, M. J. The bactericidal effect of silver nanoparticles. **Nanotechnology**, Bristol, v. 16, n. 10, p. 2346-2353, 2005.

MOTHERSILL, C.; SEYMOUR, C. B. Recovery of the radiation survival-curve shoulder in CHO-K1, XRS-5 and revertant XRS-5 populations. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 285, n. 2, p. 259-266, 1993.

MÜLLER, C.B., LOMAN, A., RICHTERING, W., ENDERLEIN, J. Dual-focus fluorescence correlation spectroscopy of colloidal solutions: influence of particle size. **The Journal of Physical Chemistry B**. Washington, v. 112, p. 8236–8240, 2008.

MURDOCK, R. C.; BRAYDICH-STOLLE, L.; SCHRAND, A. M.; SCHLAGGER, J. J.; HUSSAIN, S. M. Characterization of nanomaterials dispersion in solution prior to in vitro exposure using dynamic light scattering technique. **Toxicology Science**, Oxford, v. 101, p. 239–253, 2008.

NALLATHAMBY, P. D.; XU, X. H. Study of cytotoxic and therapeutic effects of stable and purified silver nanoparticles on tumor cells. **Nanoscale**, London, v. 2, n. 6, p. 942–952, 2010.

NATARAJAN, A. T.; OBE, G.; VANZEELAND, A. A.; PALLITI, F.; MEIJERS, M.; VERDEGAAL-IMMERZEEL, E. A. M. Molecular mechanisms involved in the production of chromosomal aberration, II. Utilization of Neurospora endonuclease for the study of

aberration production by X-rays in G1 and G2 stage of the cell cycle. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 69, p. 293-305, 1980.

NATARAJAN, A. T.; OBE, G. Molecular mechanisms involved in the production of chromosomal aberration in mammalian cells. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 95, p. 1-6, 1984.

NAVARRO, E.; PICCAPIETRA, F.; WAGNER, B.; MARCONI, F.; KAEGI, R.; ODZAK, N.; SIGG, L.; BEHRA, R. Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. **Environmental Science and Technology**, Washington, v. 42, n. 23, p. 8959-8964, 2008.

NEHL, C. L.; LIAO, H.; HAFNER, J. H. Optical properties of star-shaped gold nanoparticles. **Nano Letters**, Washington, v. 6, p. 683–688, 2006.

NOWACK, B.; KRUG, H. F.; HEIGHT, M. 120 Years of Nanosilver History: Implications for Policy Makers. **Environmental Science & Technology**, Washington, v. 45, n.4, p 1177–1183, 2011.

NURMI, J. T.; TRATNYEK, P. G.; SARATHY, V.; BAER, D. R.; AMONETTE, J. E.; PECHER, K.; WANG, C.; LINEHAN, J. C.; MATSON, D. W.; PENN, R. L.; DRIESSEN MD. Characterization and properties of metallic iron nanoparticles: Spectroscopy, electrochemistry, and kinetics. **Environmental Science and Technology**, Washington, v. 39, n. 5, p.1221–1230, 2005.

NYMARK, P.; CATALÁN, J.; SUHONEN, S.; JÄRVENTAU, H.; BIRKEDAL, R.; CLAUSEN, P. A.; JENSEN, K. A.; VIPPOLA, M.; SAVOLAINEN, K.; NORPPA, H. Genotoxicity of polyvinylpyrrolidone-coated silver nanoparticles in BEAS 2B cells. **Toxicology**, Philadelphia, 2012.

OBERDÖRSTER, G.; OBERDÖRSTER E.; OBERDÖRSTER, J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles **Environmental Health Perspectives**, Durham, v. 113, p. 823- 839, 2005.

ORDZHONIKIDZE, C. G.; RAMAIYYA, L. K.; EGOROVA, E. M.; RUBANOVICH, A. V. Genotoxic effects of silver nanoparticles on mice in vivo. **Acta Naturae**, Moscow, v. 3, p. 99-101, 2009.

O'REILLY, J.P.; MOTHERSILL, C. Comparative effects of UV A and UV B on clonogenic survival and delayed cell death in skin cell lines from humans and fish. **International Journal of Radiation Biology**, London, v. 72, p.111–119, 1997.

PANDA, K. K.; ACHARY, V. M.; KRISHNAVENI, R.; PADHI, B. K.; SARANGI, S. N.; SAHU, S. N.; PANDA, B. B. In vitro biosynthesis and genotoxicity bioassay of silver nanoparticles using plants. **Toxicology in vitro**, Philadelphia, v. 25, n.5, p.1097-105, 2011.

PANKHURST, Q. A.; CONNOLLY, J.; JONES, S. K.; DOBSON, J. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. **Journal of Physics D: Applied Physics**, Bristol, v. 36, p. 167, 2003.

- PAL, S.; TAK, Y. K.; SONG, J. M. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. **Applied and Environment Microbiology**, Bristol, v. 73, n. 6, p. 1712-1720, 2007.
- PAPAGEORGIOU I.; BROWN, C.; SCHINS, R.; SINGH, S.; NEWSON, R.; DAVIS, S., et al. The effect of nano and micron-sized particles of cobalt–chromium alloy on human fibroblasts in vitro. **Biomaterials**, Philadelphia, v. 28, p. 2946–58, 2007.
- PARK, E. J.; YI, J.; KIM, Y.; CHOI, K.; PARK, K. Silver nanoparticles induce cytotoxicity by a Trojan-horse type mechanism. **Toxicology in Vitro**. v. 24, n.3, p.872-878, 2010.
- PARK, M. V. D. Z.; LANKVELD, D. P. K.; VAN LOVEREN, H.; DE JONG, W. H. The status of *in vitro* toxicity studies in the risk assessment of nanomaterials. **Nanomedicine**, Philadelphia, v. 4 n. 6, p. 669–685, 2009.
- PARK, M. V.; NEIGH A. M.; VERMEULEN, J. P.; DE LA FONTEYNE, L. J.; VERHAREN, H. W.; BRIEDÉ J. J.; VAN LOVEREN, H.; DE JONG, W. H. The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles. **Biomaterials**, Philadelphia, v. 36, p. 9810-7, 2011.
- PATLOLLA, A. K.; BERRY, A.; MAY, L.; TCHOUNWOU, P. B. Genotoxicity of silver nanoparticles in *Vicia faba*: a pilot study on the environmental monitoring of nanoparticles. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, Basel, v. 9, n. 5, p. 1649-62, 2012
- POWERS, C. M.; BADIREDDY, A. R.; RYDE, I. T.; SEIDLER, F. J.; SLOTKIN, T. A. Silver Nanoparticles Compromise Neurodevelopment in PC12 Cells: Critical Contributions of Silver Ion, Particle Size, Coating, and Composition. **Environmental Health Perspectives**, Durham, v. 119, p. 37-44, 2011.
- PRESTON, J. R; AU, W; BENDER, M. A.; BREWEN, J. G.; CARRANO, A.V.; HEDDLE, J. A.; MCFEE, A. F.; WOLFF, S.; WASSOM, J. S. Mammalian in vivo and in vitro cytogenetic assay: a report of the U.S.EPA's Gene Tox Program. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 87, p. 143-188, 1981.
- PRESTON, R. J.; SAN SEBASTIAN, J. R.; MCFEE, A. F. The in vitro human lymphocyte assay for assessing the clastogenicity of chemical agents. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 189, p. 175-183, 1987.
- PUCK, T. T.; MARKUS, P. I. Action of X-rays on mammalian cells. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 103, p. 653–666, 1956.
- QIN, Y. Silver-containing alginate fibres and dressings. **International Wound Journal**, Oxford, v.2, p.172-6, 2005.
- QUILES, J. L.; HUERTAS, J. R.; BATTINO, M.; MATAIX, J.; RAMÍREZ-TORTOSA, M. C. Antioxidant nutrients and adriamycin toxicity. **Toxicology**, Philadelphia, v. 180, n.1, p.79-95, 2002.

- RAHMAN, M. F.; WANG, J.; PATTERSON, T. A.; SAINI, U. T.; ROBINSON, B. L.; NEWPORT, G. D, et al. Expression of genes related to oxidative stress in the mouse brain after exposure to silver-25 nano particles. **Toxicology Letters**, Philadelphia, v.187, p.15–21, 2009.
- ROEHM, N. W.; RODGERS, G. H.; HATFIELD, S. M.; GLASEBROOK, A. L. An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. **Journal of Immunological Methods**, Philadelphia, v. 142, p. 257–265. 1991.
- ROJAS, E.; LOPEZ, M. C.; VALVERDE, M. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, Philadelphia, v. 722, p. 225-254, 1999.
- RUDGE, S.; PETERSON, C.; VESSELY, C.; KODA, J.; STEVENS, S.; CATTERALL, L. Adsorption and desorption of chemotherapeutic drugs from a magnetically targeted carrier (MTC). **Journal of Controlled Release**, Philadelphia, v. 74, p. 335-40, 2001.
- RUNGBY, J. An experimental study on silver in the nervous system and on aspects of its general cellular toxicity. **Danish Medical Bulletin**, Copenhagen, v.37, p. 442–449, 1990.
- SALVADORI, D. M. F.; RIBEIRO, L. R.; FENECH, M. Teste do Micronúcleo em Células Humanas *in vitro*. In: RIBEIRO, L. R., SALVADORI, D. M. F., MARQUES, E. K. **Mutagênese ambiental**, Canoas: Ed. ULBRA, 2003, p. 201-224.
- SIMINOVITCH, L. On the nature of heritable variation in cultured somatic cells. **Cell**, Cambridge, v.7, p.1-11, 1976.
- SINGH, N.; MANSHIAN, B.; JENKINS, G. J.; GRIFFITHS, S. M.; WILLIAMS, P. M.; MAFFEIS, T. G.; WRIGHT, C. J.; DOAK, S. H. NanoGenotoxicology: the DNA damaging potential of engineered nanomaterials. **Biomaterials**, Philadelphia, v.30, p. 3891–3914, 2009.
- SINGH, N. P. A Simple Method for Accurate Estimation of Apoptotic Cells. **Experimental Cell Research**, Philadelphia, v. 256, p. 328-337, 2000.
- SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. E. L. A Simple Technique for Quantification of Low DNA Levels of DNA Damage in Individual Cells. **Experimental Cell Research**, Philadelphia, v. 175, p. 184-191, 1988.
- SINGH R. P., RAMARAO, P. Cellular uptake, intracellular trafficking and cytotoxicity of silver nanoparticles. **Toxicology Letters**, Philadelphia, v. 213, p. 249-259, 2012.
- STEPANOV, A. L.; POPOK, V. N.; HOLE, D. E. Formation of Metallic Nanoparticles in Silicate Glass through Ion Implantation. **Glass Physics and Chemistry**, London, v. 28, p. 90-5, 2002.
- SUMMERS, H. D.; REES, P.; HOLTON, M. D.; BROWN, M. R.; CHAPPELL, S. C.; SMITH, P. J.; ERRINGTON, R. J. Statistical analysis of nanoparticle dosing in a dynamic cellular system. **Nature Nanotechnology**, Philadelphia, v. 6, p. 170-174, 2011

- TAKAHASHI, C. S. Testes citogenéticos in vitro e aneuploidia. In: RIBEIRO, L. R., SALVADORI, D. M. F., MARQUES, E. K. **Mutagênese ambiental**, Canoas: Ed. ULBRA, 2003, p. 281-307.
- TEEGUARDEN, J. G.; HINDERLITER, P. M.; ORR, G.; THRALL, B. D.; POUNDS, J.G. Particokinetics in vitro: dosimetry considerations for in vitro nanoparticle toxicity assessments. **Toxicological Sciences**, Oxford, v. 95, p. 300–312, 2007.
- THOMAS, P.; UMEGAKI, K.; FENECH, M. Nucleoplasmic bridges are a sensitive measure of chromosome rearrangement in the cytokinesis-block micronucleus assay. **Mutagenesis**, Oxford, v. 18, p. 187–194, 2003.
- THROBACK, I. N.; JOHANSSON, M.; ROSENQUIST, M.; PELL, M.; HANSSON, M.; HALLIN, S. Silver (Ag+) reduces denitrification and induces enrichment of novel nirK genotypes in soil. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 270, n. 2, p. 189-194. 2007.
- WANG, H.; CHENG, H.; WANG, F.; WEI, D.; WANG, X. An improved 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) reduction assay for evaluating the viability of Escherichia coli cells. **Journal of Microbiological Methods**, Philadelphia, v. 82, n. 3, p. 330–333, 2010.
- WANG, S.; YU, H.; WICKLIFFE, J. K. Limitation of the MTT and XTT assays for measuring cell viability due to superoxide formation induced by nano-scale TiO. **Toxicology in Vitro**, Philadelphia, v. 25, n. 8, p. 2147-2151, 2011.
- WIJNHOFEN S. W.P.; PEIJNENBURG, W. J. G. M.; HERBERTS, C. A.; HAGENS, W. I.; OOMEN, A. G.; HEUGENS, E. H. W, et al. Nano-silver—a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment. **Nanotoxicology**, London, v. 3, p. 109–138, 2009.
- WISE, S.S.; MASON, M. D.; HOLMES, A. H.; SAVERY, L. C.; LI, C. T.; GOODALE, B. C.; SHAFfLEY, F.; WISE, J. P.; CRAIG, G.; WALTER, R. B.; PAYNE, R.; KERR, I. A. R.; SPAULDING, M.; WISE, J. P. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human and marine cell lines. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, Oxford, v. 48, n.7, p. 606, 2007.
- YE, J.; VAN DORPE, P.; VAN ROY, W.; BORGHS, G.; MAES, G. Fabrication, characterization, and optical properties of gold nanobowl submonolayer structures. **Langmuir**, Washington, v. 25, p. 1822–1827, 2009.
- YEZHELYEV, M. V.; GAO, X.; XING, Y.; HAJJ, A. A.; NIE, S.; REGAN, R. M. O. Emerging use of nanoparticles in diagnosis and treatment of breast cancer. **The Lancet Oncology**, Philadelphia, v. 7, p. 657–667, 2006.
- ZDZIENICKA, M. Z. Mammalian mutant's defective in the response to ionizing radiation-induced DNA damage. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 336, p. 203-213, 1995.
- ZHANG, S.; LI, J.; LYKOTRAFITIS, G.; BAO, G.; SURESH, S. Size-dependent endocytosis of nanoparticles. **Advanced Materials**, Oxford, v. 20, p. 1–6, 2009.

ZHU, X.; CHEN, J.; SCHEIDELER, L.; REICHL, R.; GEIS-GERSTORFER, J. Effects of topography and composition of titanium surface oxides on osteoblast responses. **Biomaterials**, Philadelphia, v. 25, p. 4087–4103, 2004.

ZUHUANG, J. Bactericidal nanosilver cloth and its making process and use. Patent number CN 1387700. 2003.