CAROLINA MACIEL NOGUEIRA

Ação de micro e nanopartículas de dióxido de titânio sobre a resposta inflamatória no intestino delgado de camundongos

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

Programa de Gastroenterologia Clínica

Orientador: Prof. Dr. Aytan Miranda Sipahi

SÃO PAULO

2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Nogueira, Carolina Maciel
Ação de micro e nanopartículas de dióxido de titânio sobre a resposta inflamatória no intestino delgado de camundongos / Carolina Maciel Nogueira. São Paulo, 2010.
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Gastroenterologia Clínica.
Orientador: Aytan Miranda Sipahi

.

Descritores: 1.Dióxido de titânio 2.Partículas 3.Intestino delgado 4. Inflamação 5.Camundongos

USP/FM/DBD-367/10

Agradecimentos

Ao meu orientador, Dr. Aytan Sipahi, pelo carinho, atenção e pela experiência de vida que me proporcionou ao longo da minha trajetória como pós-graduanda;

Aos meus colegas do laboratório de gastroenterologia (LIM 07) pelo afeto, apoio e indispensável colaboração durante esses anos;

À minha família, aos meus amigos e ao meu namorado que me incentivaram e me ajudaram a superar os momentos difíceis.

Esta dissertação foi elaborada de acordo com as seguintes normas:

Referências: adaptado de *International Comitee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de Tabelas

Lista de Figuras

Lista de Abreviaturas e Siglas

Resumo

Sumary

INTRODUÇÃO 1

1. Micropartículas de TiO_2 1

2. Nanopartículas de TiO_2 3

3. Captação de partículas pelo trato gastrointestinal 4

4. Efeitos adversos do TiO_2 5

4.1 Efeitos sobre o Trato Gastrointestinal 6

4.2 Efeitos de Nanopartículas *versus* Micropartículas de TiO_2 8

5. Justificativa do estudo 9

OBJETIVOS 11

MÉTODOS 13

1. Protocolo experimental 13

1.1 Animais 13

1.2 Administração das partículas 13

1.3 Coleta dos tecidos 15

2. Avaliação da resposta inflamatória 15

2.1 Avaliação histopatológica do intestino 15

2.2 Infiltração de células inflamatórias 16

2.3 Quantificação de citocinas 18

3. Análise de TiO_2 no intestino delgado 19

4. Análise dos resultados 19

RESULTADOS 21

1. Avaliação do peso corpóreo 21

2. Presença de TiO_2 no intestino delgado 22

3. Avaliação histopatológica do intestino delgado 22

4. Quantificação de citocinas 25

5. Infiltração de células inflamatórias 31

DISCUSSÃO 35

1. Presença de TiO_2 no intestino delgado 35

2. Peso corpóreo 35

3. Avaliação histopatológica 36

4. Resposta Inflamatória 37

5. Efeitos de micropartículas vs nanopartículas de TiO_2 39

6. Considerações finais 40

CONCLUSÃO 43

ANEXOS 44

ANEXO-1 Aprovação do Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq.. 45

REFERÊNCIAS 46

Lista de Tabelas

Tabela 1 Média de ingestão total diária por pessoa no Reino Unido de MP TiO_2 presente em alimentos, medicamentos e pasta de dente..... 2

Tabela 2 Algumas das categorias de produtos alimentícios cujo uso de dióxido de titânio é permitido pela ANVISA..... 3

Tabela 3 Anticorpos utilizados para as reações de imunohistoquímica..... 17

Tabela 4 Concentração de titânio no intestino delgado (mg/Kg de tecido) dos animais de acordo com os grupos..... 22

Tabela 5 Avaliação histopatológica no duodeno de acordo com os grupos. 24

Tabela 6 Avaliação histopatológica no jejuno de acordo com os grupos.... 25

Tabela 7 Avaliação histopatológica no íleo de acordo com os grupos..... 25

Lista de Figuras

Figura 1 Relação do peso dos animais ao final do tratamento e no início do tratamento, de acordo com os grupos..... 22

Figura 2 Média e EPM da concentração de citocinas pró- inflamatórias no jejuno, de acordo com os grupos..... 26

Figura 3 Média e EPM da concentração de citocinas pró- inflamatórias no íleo de acordo com os grupos..... 27

Figura 4 Média e EPM da concentração de citocinas relacionadas à resposta imune do tipo Th1 no jejuno de acordo com os grupos... 27

Figura 5 Média e EPM da concentração de citocinas relacionadas à resposta imune do tipo Th1 no íleo de acordo com os grupos..... 28

Figura 6 Média e EPM da concentração de citocinas relacionadas à resposta imune do tipo Th2 no jejuno de acordo com os grupos... 29

Figura 7 Média e EPM da concentração de citocinas relacionadas à resposta imune do tipo Th2 no íleo de acordo com os grupos..... 29

Figura 8 Média e EPM da concentração de citocinas relacionadas à resposta imune do tipo Th17 no jejuno de acordo com os grupos..... 30

Figura 9 Média e EPM da concentração de citocinas relacionadas à resposta imune do tipo Th17 no íleo, de acordo com os grupos..... 30

Figura 10 Média e EPM da concentração de TGFb no jejuno e íleo, de acordo com os grupos..... 31

Figura 11 Média e EPM de células T CD4+ no duodeno, jejuno e íleo, de acordo com os grupos..... 32

Figura 12 Média e EPM de células T CD8+ no duodeno, jejuno e íleo, de acordo com os grupos..... 33

Figura 13 Média e EPM de células NK no duodeno, jejuno e íleo, de acordo com os grupos..... 33

Figura 14 Média e EPM de células dendríticas no duodeno, jejuno e íleo, de acordo com os grupos..... 34

Lista de Abreviaturas e Siglas

ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BPF Boas Práticas de Fabricação

DC Doença de Chron

DII Doença Inflamatória Intestinal

ELISA *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*

EPM erro padrão da média

ICP-AES Espectrometria de emissão atômica com plasma induzido

IFNg interferon gama

IL interleucina

KC *Keratinocyte Chemoattractant*

Kg kilograma

LPS lipopolissacárides

mg miligrama

ul microlitro

um micrômetro

mm^2 milimetro quadrado

nm nanômetro

MP micropartícula

NP nanopartícula

pg picograma

rpm rotações por minuto

TGFb Fator de transformação do crescimento beta

TGI trato gastrointestinal

Ti titânio

TiO_2 dióxido de titânio

TNFa fator de necrose tumoral alfa

vs versus

^{o}C graus Célcius

Nogueira CM. *Ação de micro e nanopartículas de dióxido de titânio sobre a resposta inflamatória no intestino delgado de camundongos* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010

Introdução: O dióxido de titânio (TiO_2) é um corante encontrado na forma de partículas em diversos produtos industrializados. Muitos estudos, a maioria envolvendo o trato respiratório, alertam sobre os efeitos prejudiciais advindos da exposição ao TiO_2. Embora partículas da dieta, tais como o TiO_2, sejam ingeridas diariamente, ainda existem poucos estudos investigando seus efeitos sobre o trato gastrointestinal. **Objetivos:** O objetivo principal desse trabalho é investigar a ação de nano (NP) e micropartículas (MP) de TiO_2 sobre a resposta inflamatória no intestino delgado de camundongos. **Material e Métodos:** Camundongos Bl 57/6 foram divididos em 2 grupos experimentais, os quais receberam NP TiO_2 (66 nm) ou MP TiO_2 (260 nm) a uma dose de 100 mg/Kg/dia, e um grupo controle, o qual recebeu água destilada. O tratamento foi administrado por gavagem, durante 10 dias, uma vez ao dia. Ao final, o intestino delgado foi coletado para a análise de citocinas (IL-1b, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, IL-23, TNFa, IFNg e TGFb) por ELISA e quantificação de células T $CD4^+$, T $CD8^+$, células dendríticas e *natural killers* por imunohistoquímica. **Resultados:** Os resultados demonstram maior concentração de citocinas IL-12, TNFa, IFNg, IL-4, IL-23 e TGFb, e células T $CD4^+$ nos grupos que receberam TiO_2. O aumento de citocinas foi mais importante no íleo, onde há maior concentração de células M, as quais representam a principal via de captação de partículas no intestino. **Conclusão:** As partículas de TiO_2 provocaram uma resposta pró-inflamatória, predominantemente do tipo Th1, no intestino delgado dos camundongos, especialmente no íleo. Esses dados representam uma evidência *in vivo* do potencial inflamatório de partículas de TiO_2 sobre o trato gastrointestinal. .

Descritores: dióxido de titânio; partículas; intestino delgado; inflamação; camundongos.

Nogueira CM. *Effects of micro and nano-sized titanium dioxide on the inflammatory response on small intestine in mice.* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010

Introduction: Titanium dioxide (TiO_2) is a white pigment widely found as micro and nano-sized particles added to food, drugs, cosmetics, etc. Studies involving the pulmonary tract warn about adverse effects resulting from exposure to TiO_2, emphasizing its inflammatory potential. Although the gastrointestinal tract is considerably exposed to TiO_2 particles at daily basis there are few information regarding its adverse effects on intestine. **Objectives:** We aimed to investigate the effects of TiO_2 nanoparticles (NP) and microparticles (MP) on inflammatory response in the small intestine of mice. **Methods:** Bl 57/6 mice received suspensions containing TiO_2 (100 mg/Kg/day) as TiO_2 NP (66 nm), or TiO_2 MP (260 nm) by gavage for 10 days, once a day; control group received only distilled water. At the end of the treatment, the small intestine were extracted for assessment of cytokines (IL-1b, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, IL-23, TNFa, IFNg e TGFb) by ELISA and quantification of inflammatory cells (T $CD4^+$, T $CD8^+$, dendritic cells, and *natural killer)* by immunohistochemistry. **Results:** We found increased levels of T $CD4^+$ cells and cytokines (IL-12, TNFa, IFNg, IL-4, IL-23, and TGFb) on groups receiving TiO_2 when compared to control group. Cytokines production was more important on the ileum, local presenting greater concentration of M cells, which represent the main pathway of particles uptake on gut. **Conclusion:** Our findings indicate that TiO_2 particles induce a Th1 – mediated inflammatory response on small bowel in mice. These results represent an *in vivo* evidence of the inflammatory potential of TiO_2 particles on the gastrointestinal tract.

Keywords: titanium dioxide particles, small intestine, inflammation; mice

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

Diariamente somos expostos por inalação, ingestão ou contato a diversos tipos de partículas presentes no ambiente, bem como em uma infinidade de produtos industrializados. A mucosa intestinal está continuamente exposta a partículas da dieta, tais como o **dióxido de titânio** (TiO_2), um pó branco insolúvel utilizado como agente branqueador e antiaglomerante pela indústria, o qual é encontrado em uma grande variedade de produtos, tais como alimentos, medicamentos, cosméticos, tintas, papel, entre outros (NIOSH 2005). O TiO_2 pode ser encontrado na forma de *micropartículas* (MP) ou *nanopartículas* (NP).

1. Micropartículas de TiO_2

Micropartículas são partículas apresentando tamanho entre 0.1 e 100 micrômetros (um). O TiO_2 na forma de micropartículas é um aditivo alimentar muito utilizado, sendo encontrado em diversos alimentos ingeridos diariamente, tais como balas e confeitos, molhos para salada, bebidas em pó, além de ser adicionado em pasta de dente e como excipiente em diversos medicamentos. Segundo um estudo de Lomer e col. (2004), partículas de TiO_2 são ingeridas em quantidades consideráveis (Tabela 1).

Tabela 1 - Média de ingestão total diária por pessoa no Reino Unido de MP TiO_2 presente em alimentos, medicamentos e pasta de dente.*

Ingestão Total (mg/pessoa/dia)	Alimentos (%)	Medicamentos (%)	Pasta de dente (%)
5,9	**47,0**	**48,0**	**5,0**

* Lomer e col. (2004)

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) considera o dióxido de titânio um aditivo alimentar com a função de corante. Pelo Sistema Internacional de Numeração de Aditivos Alimentares (*International Numbering System* - INS) do *Codex Alimentarius* o TiO_2 é identificado como INS 171. Os limites de uso do TiO_2 seguem a determinação da ANVISA referente aos aditivos utilizados segundo as Boas Práticas de Fabricação (BPF). Um aditivo é considerado BPF quando possui Ingestão Diária Aceitável (IDA) "não especificada". Segundo a ANVISA, aditivos BPF são "utilizados em quantidade "*quantum satis*", ou seja, quantidade suficiente para obter o efeito desejado, sempre que o aditivo não afetar a identidade e genuinidade do alimento, seu uso não resultar em práticas enganosas e a função estiver aceita para o alimento em questão".

A Tabela 2 apresenta alguns exemplos de categorias de produtos alimentícios cujo uso de TiO_2 é permitido pela ANVISA.

Tabela 2 - Algumas das categorias de produtos alimentícios cujo uso de dióxido de titânio é permitido pela ANVISA

Categorias de produtos
Balas, caramelos, pastilhas, confeitos
Balas de goma e de gelatina
Goma de mascar (chicle)
Torrones, marzipans
Barras de cereais
Biscoitos e similares com ou sem recheio
Bolos, tortas, doces e massas de confeitaria
Gelatinas e pós para o preparo de gelatinas
Gelados comestíveis e misturas e pós para o preparo de gelados comestíveis
Coberturas, xaropes e recheios para produtos de panificação e confeitaria
Molhos emulsionados e a base de maionese
Sopas e caldos prontos para o consumo
Bebidas não alcoólicas e pós para o preparo de bebidas não alcoólicas
Suplementos vitamínicos e de minerais

2. Nanopartículas de TiO_2

Nanopartículas (NP) são consideradas partículas com o diâmetro menor que 100 nanômetros (nm), embora o termo *partícula ultrafina* seja geralmente utilizado como sinônimo para nanopartícula. Materiais em escala nano são desenvolvidos com a finalidade de apresentar propriedades características, com base em seu tamanho, forma, superfície, etc. (Robichaud e col. 2005). Dependendo do material utilizado para produzir as NP, propriedades como

solubilidade, condutividade, cor, absorção, entre outras, são modificadas apenas pela variação no tamanho da partícula (Borm e col. 2006).

Há décadas a indústria tem produzido diversos tipos de NP, tais como o TiO_2, para sua utilização em pigmentos, resinas, cosméticos, medicamentos, etc., e o avanço da nanotecnologia aumentará a produção de novos materiais e produtos à base de nanopartículas com novas propriedades físico-químicas, embora sua toxicidade ainda seja desconhecida (Borm e col. 2006). Mesmo que diversos estudos referindo-se à toxicidade de nanopartículas e nanomateriais estejam surgindo, ainda não foram estabelecidas afirmações concretas quanto ao seu impacto na saúde e no ambiente (Robichaud e col. 2005).

3. Captação de partículas pelo trato gastrointestinal

A captação de partículas pelo trato gastrointestinal (TGI) parece depender do tamanho da partícula, de modo que as menores parecem ser absorvidas em maior escala. Sugere-se haver três possíveis mecanismos de captação de nanopartículas no TGI: (1) intracelular; (2) intracelular/paracelular; e (3) captação através das células M nas Placas de Peyer. No entanto, o mecanismo predominante parece ser o terceiro (Kreuter 1991; Florence 1997).

MPs TiO_2 são resistentes à degradação gastrointestinal, e quando ingeridas podem se ligar a biomoléculas no lúmen ou ser absorvidas pela mucosa intestinal, acumulando-se nos macrófagos do tecido linfóide (Placas de Peyer) no intestino (Lomer e col. 2002).

Jani e col. (1994) observaram que após administração de $MPTiO_2$ (500 nm) por gavagem, o local onde houve maior captação de partículas no TGI foi nas placas de Peyer, rico em tecido linfóide e células fagocitárias. Segundo a rota de

translocação proposta pelos autores, as partículas chegam ao mesentério e se acumulam nos nódulos, de modo que uma parte alcança a circulação e é captada por órgãos como fígado e baço. Outros autores (Li e col. 2009) reforçaram a importância da via de captação de partículas representada pelas células M ao relatarem maior absorção de nanopartículas lipídicas no íleo e cólon, atribuindo tais achados à maior presença de placas de Peyer, e assim células M, nesses segmentos.

4. Efeitos adversos do TiO_2

Diversos estudos relatam os efeitos adversos oriundos da exposição ao TiO_2, tais como citotoxicidade (Wang e col. 2007), geração de espécies reativas de oxigênio (Jin e col. 2008, Kim e col. 2010, Wang e col. 2010), tumores (Borm e col. 2000), inflamação (Ferin e col. 1992, Oberdörster e col. 1992, 1994, Borm e col. 2000, Chen e col. 2006, Park e col. 2009, Schanen e col. 2009), reações alérgicas (Haar e col. 2006), enfisema pulmonar (Chen e col. 2006), entre outros.

Uma revisão realizada para o Centro Europeu de Ecotoxicologia e Toxicologia de produtos químicos (*European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals - ECETOC)* (Borm e col. 2006) sobre os riscos potenciais de nanomateriais, mostrou que certas NP provocaram reações inflamatórias relacionadas ao estresse oxidativo, o que levanta a necessidade de estudos adicionais para esclarecer o que foi observado e caracterizar o seu impacto fisiológico.

Park e col. (2009) observaram a produção de citocinas (IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-12, TNF alfa e IFN gama), de proteínas pró-inflamatórias (MIP e MCP) e

IgE no pulmão de camundongos expostos à $NPTiO_2$ por instilação intratraqueal, bem como a proliferação de células B e formação de granulomas, sugerindo que as $NPTiO_2$ poderiam representar um dos gatilhos responsáveis por auto-imunidade e inflamação crônica nesse órgão.

NP insolúveis podem se alojar nos pulmões, TGI e cérebro e permanecer durante anos. Embora sejam menos capturadas por macrófagos, interagem com as células epiteliais, intersticiais e vasculares, permitindo respostas pró-inflamatórias dessas células, as quais geralmente não entram em contato com tais partículas. Além disso, NP podem se ligar a proteínas ou ser translocadas para a circulação, alcançando órgãos como fígado, baço, rins, coração e cérebro (Borm e col. 2006). NP inaladas e aderidas ao muco do aparelho respiratório podem ser engolidas e alcançar o trato gastrointestinal (Wang e col. 2008). Estudos em animais com NP marcadas com radioativo demonstraram que 30 a 50% de NPs inaladas são translocadas para o TGI (Madl e Pinkerton 2009).

4.1 Efeitos sobre o Trato Gastrointestinal

Micropartículas, ao se ligarem a biomoléculas no lúmen intestinal, podem agir como adjuvantes na secreção de citocinas, além de terem ação sobre o mecanismo de apresentação de antígenos, uma vez que antígenos solúveis podem ser adsorvidos por micropartículas e fagocitados juntamente com elas no intestino (Lomer e col. 2002).

Powell e col. (2000) demonstraram que quando micropartículas de TiO_2 adsorvem lipopolissacarídeos de bactérias (LPS), ambos ânions, a interação é muito facilitada pela presença de cátions bivalentes, tais como o Ca^{+2} (íon cálcio),

permitindo a geração do complexo TiO_2-Ca_2-LPS, o qual estimulou o aumento da secreção de IL-1 no intestino, resultado que não foi observado na presença de TiO_2 ou LPS sozinhos. Tais eventos foram reafirmados por estudo de Ashwood e col. (2007), o qual demonstrou que o complexo TiO_2-Ca_2-LPS induz morte celular e liberação de IL-1β, imitando o efeito inflamatório de determinados patógenos entéricos. Ou seja, a adsorção de fragmentos de bactérias à micropartículas da dieta potencializa o mecanismo pró-inflamatório das mesmas (Ashwood e col. 2007).

No trabalho de Evans e col. (2002), a exposição de células intestinais (*in vitro*) a micropartículas de cálcio (endógenas) estimulou a apoptose de macrófagos intestinais, bem como a secreção de IL-1β, a qual foi acentuada em células intestinais extraídas de pacientes com doença inflamatória intestinal (DII), e pela adição de LPS e micropartículas de TiO_2. Tais resultados indicam que micropartículas endógenas ou exógenas poderiam agravar a inflamação já existente na DII.

Lomer e col. (2001) observaram considerável melhora na atividade da doença quando pacientes com doença de Chron (DC) consumiram uma dieta com baixo teor de cálcio, silicatos e TiO_2. Entretanto, um segundo estudo do mesmo autor (Lomer e col. 2005), envolvendo um maior número de pacientes, não confirmou os primeiros resultados, sendo que a redução de micropartículas na dieta não demonstrou benefícios em pacientes com DC em atividade.

Ramsden e col. (2009) relataram a presença de distúrbio intestinal em trutas após a ingestão acidental de $NPTiO_2$ presentes na água.

Em conjunto, esses estudos (Ashwood e col. 2007; Lomer e col. 2002; Powell e col. 2000) sugerem que partículas ingeridas diariamente, como o TiO_2, podem provocar inflamação no trato gastrointestinal ou mesmo agravar a resposta inflamatória no intestino já inflamado. Ainda são necessários mais estudos para confirmar uma possível relação entre micropartículas e a patogênese da DC; no entanto, caso ela seja corroborada, poderia explicar outras questões pertinentes, tal como a crescente incidência da doença na zona urbana e no Ocidente, uma vez que a dieta urbana apresenta significativamente maior quantidade de micropartículas na forma de aditivos de alimentos em comparação à dieta nas áreas rurais (Mahmud & Weir, 2001), bem como poderia contribuir para um novo enfoque no tratamento de pacientes portadores de DC.

4.2 Efeitos de Nanopartículas *versus (vs)* Micropartículas de TiO_2

Embora o número de estudos relatando a toxicidade do TiO_2 ainda seja limitado, alguns sugerem que partículas de TiO_2 menores produzem maior inflamação pulmonar quando comparadas a partículas maiores na mesma concentração (Ferin e col. 1990, Ferin e col. 1992, Oberdörster e col. 1992, 1994; Renwick e col. 2004, Kobayashi e col. 2009), apontando para o maior potencial inflamatório das nanopartículas em relação às micropartículas, o qual foi atribuído à sua maior superfície de contato, maior acesso ao interstício e maior retenção das partículas.

Segundo uma revisão de Donaldson e col. (1998) os mecanismos pelos quais partículas ultrafinas – ou nanopartículas – provocam danos no trato respiratório de animais envolvem: (1) sua maior superfície de contato, além do

fato de que em uma mesma dose, o número de partículas ultrafinas é maior em comparação ao número de partículas de maior tamanho; (2) o alto número de partículas ultrapassa a capacidade dos macrófagos expostos de fagocitá-las, o que ocasiona uma sobrecarga de partículas não-fagocitadas a permanecerem em contato com as células epiteliais; (3) em virtude de seu menor tamanho e composição química de sua superfície, nanopartículas podem ser captadas por células epiteliais; (4) ocorre estresse oxidativo em macrófagos que fagocitam nanopartículas e nas células epiteliais em contato com partículas não-fagocitadas, o que induz toxicidade, secreção de citocinas e aumento da permeabilidade, culminando em inflamação contínua.

5. Justificativa do estudo

O mercado de materiais em escala nano vem crescendo, aumentando assim a presença desses materiais no ambiente. Se essa tendência persistir, será cada vez mais importante compreender os potencias efeitos adversos relacionados aos nanomateriais.

Embora o pulmão seja o órgão mais estudado quanto à sua exposição a partículas como o TiO_2, comparativamente, o trato gastrointestinal está consideravelmente mais exposto a partículas do ambiente. Micro e nanopartículas são ingeridas em altos níveis diariamente (Lomer e col. 2004); contudo, ainda existem poucos estudos investigando a exposição do trato gastrointestinal ao TiO_2. Assim, consideramos pertinente investigar e comparar a ação de nano e micropartículas de TiO_2 sobre a mucosa intestinal, verificando possíveis respostas imunes no intestino, tal como a liberação de citocinas pró-inflamatórias.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Objetivo geral

O objetivo desse estudo é investigar a ação de micro e nanopartículas de TiO_2 sobre a resposta inflamatória no intestino delgado de camundongos.

Objetivos específicos

- ✓ Avaliar o processo inflamatório através do perfil de citocinas e infiltração de células inflamatórias no intestino delgado dos camundongos submetidos ao tratamento com micro e nanopartículas de TiO_2;
- ✓ Verificar alterações histopatológicas no intestino delgado de camundongos submetidos ao tratamento com micro e nanopartículas de TiO_2.
- ✓ Comparar os efeitos entre micro e nanopartículas de TiO_2 sobre a resposta inflamatória no intestino delgado de camundongos;

MÉTODOS

MÉTODOS

1. Protocolo experimental

1.1 Animais

Camundongos Bl 57/6 pesando entre 20 e 25 gramas foram utilizados para a realização dos experimentos. Os animais foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

O experimento foi realizado com a aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Anexo – 1).

1.2 Administração das partículas

As partículas de TiO_2 foram administradas aos animais por gavagem (Jani e col. 1994; Warheit e col. 2007; Coppi e col. 2008), uma vez ao dia, durante o período da manhã, por 10 dias.

Utilizamos amostra de nanopartículas de TiO_2 ($NPTiO_2$) produzidas e fornecidas pelo Prof. Walter M. Azevedo do Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). As $NPTiO_2$ utilizadas apresentam diâmetro médio de 66 nm. O tamanho das partículas foi determinado pela técnica de espalhamento de luz dinâmico (*dynamic light scattering*) no equipamento Nanotrac® (Microtrac Inc., USA) pelo Prof. Sérgio Hiroshi Toma do Laboratório de Química Supramolecular e Nanotecnologia do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. As micropartículas de TiO_2 utilizadas ($MPTiO_2$) são comercializadas por *Evonik Degussa* (Kronos® 1171) e

apresentam tamanho médio de 260 nm (informado pelo fabricante). A dose de MP e NP de TiO_2 foi de 100 mg/Kg de peso/dia, sendo esta a maior dose encontrada na literatura (Discroll e col. 1990) até o momento da realização do experimento. As partículas foram administradas na forma de uma suspensão em água destilada (500 ul). A suspensão era homogeneizada a 30.000 rpm, imediatamente antes de ser administrada aos animais, com o objetivo de minimizar a agregação das partículas.

O grupo controle recebeu apenas água destilada (500 ul), também por gavagem.

Os animais foram divididos em 3 grupos, de acordo com o tratamento:

1. $NPTiO_2$ (n = 16)
2. $MPTiO_2$ (n = 12)
3. CONTROLE (n = 12)

Durante o tratamento os animais foram mantidos em condições apropriadas e alimentados com ração comercial (Nuvilab CR1 – *Nuvital Nutrientes S/A*) e água *ad libitum*. Eles foram avaliados a cada dois a três dias com relação ao peso corpóreo, atividade e sinais de inflamação sistêmica como: ereção de pêlos, diarréia e presença de sangue nas fezes.

1.3 Coleta dos tecidos

Os animais foram sacrificados em câmera de CO_2, quatro horas após a administração da última dose do respectivo tratamento. Após o sacrifício, todo o intestino delgado (desde o piloro até a válvula ileocecal) foi retirado.

Para avaliação da infiltração de células inflamatórias e avaliação histopatológica, amostras de duodeno, jejuno e íleo foram coletadas e conservadas em solução de formaldeído a 10% por ao menos vinte e quatro horas. Após esse período, o tecido foi cortado transversalmente em cerca de 5 a 7 circunferências, as quais foram levadas ao setor de Patologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina – USP, para posterior parafinização e preparo das lâminas.

Para avaliação do perfil de citocinas, o intestino foi separado em amostras de jejuno e íleo, as quais foram armazenadas a – 80° C até o momento da realização da respectiva análise.

2. Avaliação da resposta inflamatória

2.1 Avaliação histopatológica do intestino

Cortes transversais de duodeno, jejuno e íleo foram fixados e corados com hematoxilina e eosina para a avaliação histopatológica do tecido. A análise foi realizada em microscópio óptico Nikon E 800 em aumento de 20 vezes pela Profa. Maria Lucia Zaidan Dagli do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, a título de colaboração ao trabalho.

Os parâmetros empregados para a avaliação histopatológica foram:

1) presença de infiltrado mononuclear na lâmina própria, a qual foi classificada de acordo com sua intensidade em níveis leve (1) ou moderado (2);
2) presença de folículos linfóides;
3) presença de outras alterações morfológicas nas vilosidades e criptas tais como necrose, hiperplasia ou hipertrofia dos enterócitos;

2.2 Infiltração de células inflamatórias

As células T CD4 e CD8 positivas, células *natural killers* (NK) (CD 57) e células dendríticas $S100^{+}$ foram quantificadas através da técnica de imuno-histoquímica, utilizando-se anti-corpos específicos (Tabela - 3). O método utilizado foi padronizado em colaboração com o Laboratório de Moléstias Transmissíveis do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina.

Tabela 3 – Anticorpos utilizados para as reações de imunohistoquímica

Célula	Anticorpo
T CD4 +	Dako® M0834 (clone OPD4)
T CD8 +	Dako® M7103 (clone C8/144B)
Natural Killer	Neomarkers/Lab Vision® MS-136 P
Células Dendríticas	Dako® Z0311

Cortes transversais de duodeno, jejuno e íleo dos animais tratados foram preparados em lâminas silanizadas para a posterior reação de imuno-histoquímica.

Após desparafinação e hidratação dos cortes, faz-se bloqueio de peroxidase endógena com 3 passagens de 10 minutos cada em solução de água oxigenada 3% em câmara escura. As lâminas são lavadas em água corrente por 5 minutos, água destilada e PBS (pH 7,4). A exposição antigênica é feita em banho-maria com solução Tris-EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) (pH 9,0) por 20 minutos a 95°C. Os preparados são então lavados em água corrente, destilada e em tampão PBS durante 5 minutos. Faz-se incubação com leite bovino desnatado (Molico®) a 10% em água destilada por 30 minutos à temperatura ambiente. Segue-se a incubação com os anticorpos primários diluídos em solução de albumina a 1%, "over-night" a 4ºC. A seguir, procede-se a lavagem em PBS por 10 minutos e incubação com o anticorpo secundário do kit LSAB (Dako®) durante 45 minutos a 37ºC.

Após nova lavagem em PBS é feito novo bloqueio de peroxidase endógena com 3 passagens de 5 minutos cada em solução de água oxigenada a 3% em câmara escura e em seguida, lavagem em água corrente, água destilada e tampão PBS.

Segue a incubação com complexo estreptavidina - biotina do kit LSAB durante 30 minutos a 37ºC. A revelação da reação é feita com DAB (Diaminobenzidine) (40 mg em 100 ml de PBS + 1200 ul de H_2O_2 a 3%). A contra-coloração é feita com hematoxilina. As lâminas são então desidratadas e montadas com resina.

Para a contagem das células foram fotografados dez campos de cada lâmina, em aumento de 40 vezes utilizando-se a câmera Motic 5.0 acoplada a microscópio Olympus. As imagens foram visualizadas pelo *software Mayashitra Imago 1.0* e as células foram contadas manualmente em cada imagem. O valor de

células em cada lâmina examinada foi expresso em número de células/mm^2, o qual foi determinado pela relação entre a contagem de células total divida pelo número de campos (10) sobre o valor de área do campo (0,018 mm^2).

2.3 Quantificação de citocinas

Realizamos a quantificação de doze citocinas: Interleucina-1 beta (IL-1b), IL-6, IL-8 (*Keratinocyte Chemoattractant* - KC), IL-10, IL-12 (p70), IL-17, IL-23, IL-4, IL-13, TNF-a (fator de necrose tumoral alfa), IFNg (interferon gama) e TGFb (*transforming growth factor beta*).

Para a quantificação de citocinas no tecido optamos pelo método de ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) utilizando-se kits específicos (eBioscience® para as citocinas IL-1b, IL-4, IL-6, IL-12, IL-13, IL-17, IL-23, IFN gama, TNF alfa e TGF beta, e R&D Systems® para as citocinas IL-8 e IL-10) e seguindo as recomendações do fabricante. Após o sacrifício, amostras de jejuno e íleo dos animais foram armazenadas a – 80°C. Para a quantificação das citocinas nas amostras, os tecidos foram primeiramente homogeneizados com tampão Tris (10 mM) – EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) (1 mM) - Triton (1%) contendo os inibidores de proteases aprotinina, quemostatina e leupeptina (1 ug/mL de solução) e PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) (1 ul/mL de solução). Após a homogeneização a amostra foi centrifugada em 14.000 g por 10 minutos a 4ºC e o sobrenadante separado para a quantificação de citocinas. A quantificação de proteína total foi realizada utilizando-se o kit *BCA™ Protein Assay* (Thermo Scientific®) e a leitura das amostras foi realizada em espectofotômetro (562 nm). A quantidade de citocina em cada amostra foi determinada pela relação do valor

de citocina encontrado pelo ensaio enzimático (ELISA) sobre o valor total de proteína no tecido (pg de citocina/mg de proteína).

3. Análise de TiO_2 no intestino delgado

Para avaliarmos a presença de partículas de TiO_2 no intestino delgado o protocolo experimental foi repetido com dois animais em cada grupo. Ao final do experimento, os animais foram sacrificados e todo o intestino delgado (desde o piloro até a válvula ileocecal) foi retirado e levado ao Laboratório de Análise Elementar da Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, onde os tecidos foram homogeneizados e analisados por ICP-AES (Espectrometria de emissão atômica com plasma induzido) para a quantificação de titânio (Ti) nas amostras.

4. Análise dos resultados

Os resultados foram submetidos à análise estatística com o auxílio de profissional especializado. Para os cálculos foi utilizado o software *PASW Statistics* versão 18. Para a análise dos dados, considerou-se distribuição gama (ligação identidade) e foi utilizado modelo linear generalizado. Para a comparação múltipla entre os grupos foram aplicados o teste de comparação de pares (*Pairwise Comparison*) e o ajuste de Fisher da diferença mínima significativa (*Fisher's least significant difference*). Consideramos intervalo de confiança (IC) de 95% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

RESULTADOS

1. Avaliação do peso corpóreo

Os animais foram pesados a cada 2 a 3 dias. A Figura 1 demonstra a relação entre o peso inicial e final de acordo com os grupos.

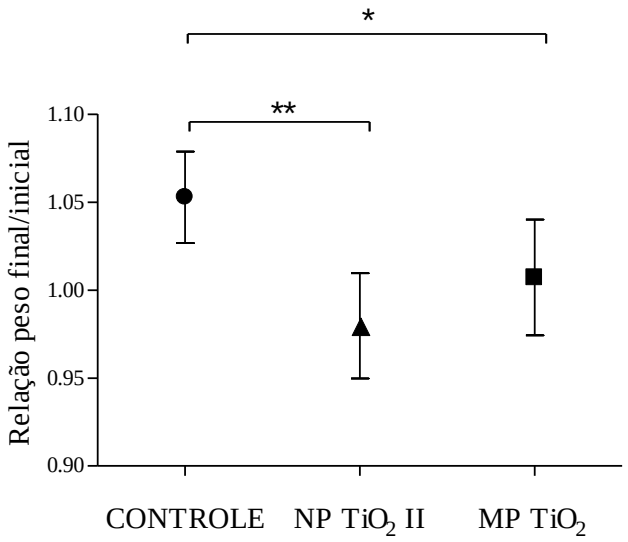

Figura 1 - Relação do peso dos animais ao final do tratamento e no início do tratamento, de acordo com os grupos

* $p < 0,05$ para o teste de comparação de pares
** $p < 0,01$ para o teste de comparação de pares

De acordo com a Figura 1 observamos que, ao final do tratamento, os grupos tratados com dióxido de titânio apresentaram ligeira perda ponderal com relação ao peso inicial, a qual foi estatisticamente significativa ($p = 0,026$ para MP TiO_2 *vs* Controle; $p = 0,00012$ para NP TiO_2 *vs* Controle). Com relação à perda de peso, não houve diferença estatisticamente significativa ao compararmos os grupos $NPTiO_2$ e $MPTiO_2$. O grupo controle foi o único que não apresentou perda de peso, ao contrário, observou-se leve ganho de peso.

2. Presença de TiO_2 no intestino delgado

Para verificarmos a presença de partículas de TiO_2 no intestino delgado enviamos os tecidos (dois animais em cada grupo) para o Laboratório de Análise Elementar da Central Analítica – Instituto de Química – USP e os mesmos foram analisados por ICP-AES (Espectrometria de emissão atômica com plasma induzido) para a quantificação de titânio (Ti) nas amostras. Os resultados estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4 – Concentração de titânio (Ti) no intestino delgado (mg/Kg de tecido) dos animais de acordo com os grupos

Grupo	Ti (mg/Kg)	
	Animal nº 1	Animal nº 2
$NPTiO_2$	1,43	11,68
$MPTiO_2$	0,39	0,22
Controle	Não detectado	Não detectado

Os resultados demonstram a ausência de titânio no intestino dos animais do grupo controle e sua presença nos animais que receberam partículas de TiO_2. A quantidade de titânio encontrada foi maior no tecido dos animais que receberam $NPTiO_2$, comparativamente ao grupo que recebeu $MPTiO_2$.

3. Avaliação histopatológica do intestino delgado

Ao final do tratamento, os animais foram sacrificados e foram coletadas amostras de duodeno, jejuno e íleo para avaliação histopatológica dos tecidos, a

qual foi realizada pela Profa. Maria Lucia Zaidan Dagli do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP.

Os resultados observados estão expostos nas **Tabelas 5 a 7** de acordo com cada região do intestino delgado analisada.

Tabela 5 – Avaliação histopatológica no duodeno de acordo com os grupos

Grupo	Presença de Infiltrado Mononuclear	Intensidade de Infiltrado Mononuclear	Presença de Folículos Linfóides	Presença de Outras Alterações
NP TiO_2	100%	Nível 1: 100% Nível 2: 0%	ausentes	hiperplasia e hipertrofia de células epiteliais: 85,7 %
MP TiO_2	100%	Nível 1: 77,8 % Nível 2: 22,2 %	ausentes	ausentes
Controle	90%	Nível 1: 100% Nível 2: 0%	ausentes	ausentes

Nível 1: leve
Nível 2: moderado

Tabela 6 – Avaliação histopatológica no jejuno de acordo com os grupos

Grupo	Presença de Infiltrado mononuclear	Intensidade de Infiltrado Mononuclear	Presença de Folículos Linfóides	Presença de Outras Alterações
NP TiO_2	100%	Nível 1: 57,2% Nível 2: 42,8%	28,6%	Hiperplasia e hipertrofia de células epiteliais: 100 %
MP TiO_2	100%	Nível 1: 66,7 % Nível 2: 33,3 %	44,4%	ausentes
Controle	100%	Nível 1: 100% Nível 2: 0%	20,0%	ausentes

Nível 1: leve
Nível 2: moderado

Tabela 7 – Avaliação histopatológica no íleo de acordo com os grupos

Grupo	Presença de Infiltrado mononuclear	Intensidade de Infiltrado Mononuclear	Presença de Folículos Linfóides	Presença de Outras Alterações
NP TiO_2	100%	Nível 1: 100% Nível 2: 0%	14,3%	hiperplasia e hipertrofia de células epiteliais: 85,7 %
MP TiO_2	100%	Nível 1: 100% Nível 2: 0%	33,3%	hiperplasia e hipertrofia de células epiteliais: 11,1 %
Controle	100%	Nível 1: 90% Nível 2: 10%	40%	ausentes

Nível 1: leve
Nível 2: moderado

De acordo com os resultados podemos observar poucas alterações histopatológicas encontradas nos tecidos dos animais que receberam TiO_2 quando em comparação aos animais do grupo controle. A principal alteração observada foi a presença de hipertrofia e hiperplasia do epitélio, a qual foi mais freqüente nos animais que receberam $NPTiO_2$, e ausente nos animais do grupo controle. O grupo que recebeu $NPTiO_2$ apresentou hiperplasia e hipertrofia da camada epitelial nas

três regiões do intestino delgado avaliadas (duodeno, jejuno e íleo). O grupo tratado com $MPTiO_2$ apresentou hiperplasia e hipertrofia do epitélio apenas no íleo, e em uma pequena parcela dos animais (11,1%).

Quanto à presença de infiltrado inflamatório, a maioria dos animais foi classificada sob o nível 1 (leve). Não foram observados infiltrados inflamatórios polimorfonucleares em nenhum dos casos analisados, apenas infiltrados mononucleares.

4. Quantificação de citocinas

Foi realizada a quantificação de doze citocinas no jejuno e íleo dos animais, sendo elas: Interleucina-1 beta (IL-1b), IL-6, IL-8 (KC), IL-10, IL-12 (p70), IL-17, IL-23, IL-4, IL-13, TNF-a, IFNg e TGFb. Os resultados são apresentados nas Figuras 2 a 10 como média e erro padrão da média (EPM) de citocinas em pg/mg de proteína.

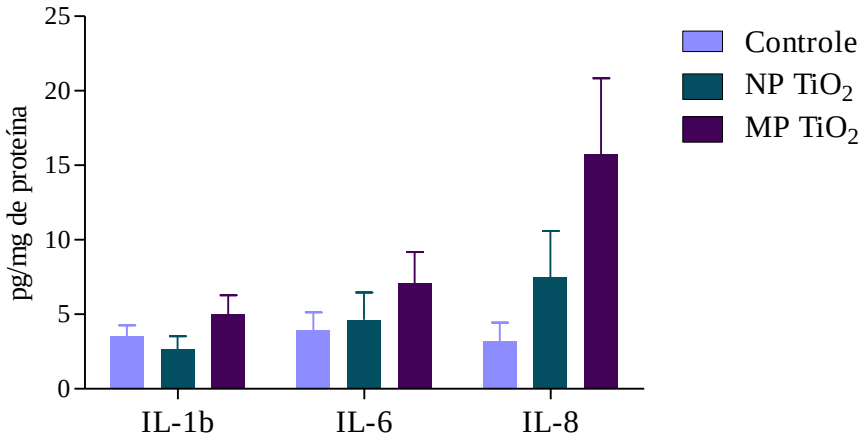

Figura 2 - Média e EPM da concentração de citocinas pró-inflamatórias no jejuno de acordo com os grupos

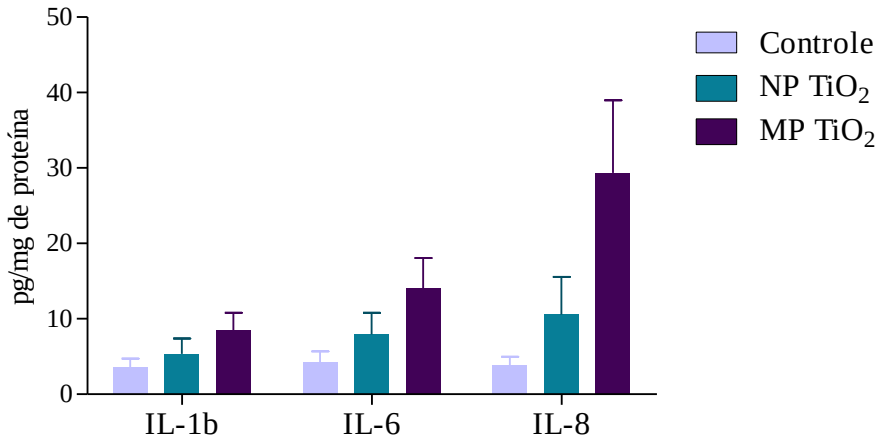

Figura 3 - Média e EPM da concentração de citocinas pró-inflamatórias no íleo de acordo com os grupos

Embora a média das citocinas IL-1b, IL-6 e IL-8 no jejuno e íleo sejam maiores nos grupos $NPTiO_2$ e $MPTiO_2$ em relação ao grupo controle (Fig. 2 e 3), não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

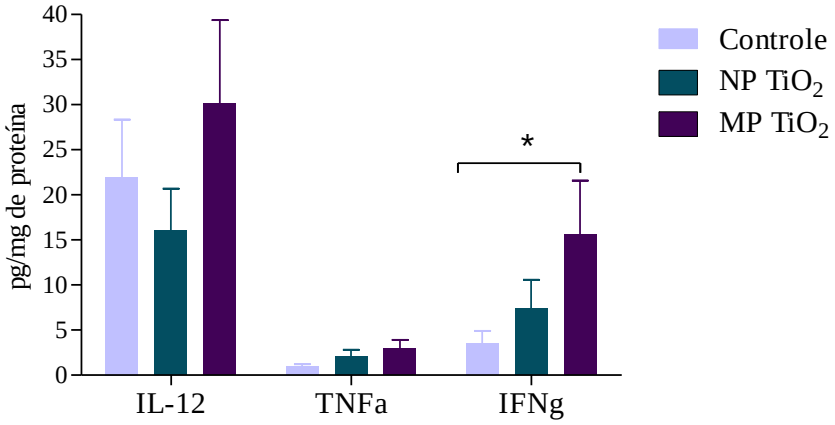

Figura 4 - Média e EPM da concentração de citocinas relacionadas à resposta imune do tipo Th1 no jejuno de acordo com os grupos

* $p < 0,05$ para o teste de comparação de pares

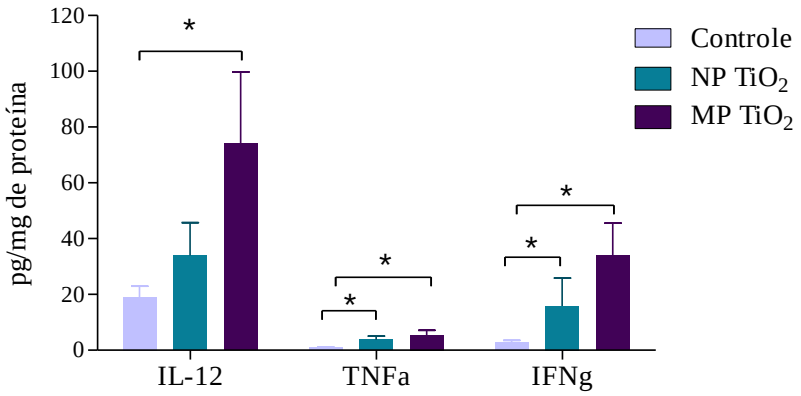

Figura 5 - Média e EPM da concentração de citocinas relacionadas à resposta imune do tipo Th1 no íleo de acordo com os grupos

* $p < 0,05$ para o teste de comparação de pares

Com relação às citocinas relacionadas ao padrão de resposta imune do tipo Th1, foram dosadas IL-12, TNFa e IFNg (Fig. 4 e 5). No jejuno, observou-se diferença estatística entre o grupo $MPTiO_2$ *vs* Grupo Controle ($p = 0,044$) apenas para o IFNg. Não foram encontradas diferenças entre os grupos $NPTiO_2$ *vs* MP TiO_2, ou $NPTiO_2$ *vs* Controle com relação a nenhuma das citocinas tipo Th1 quantificadas no jejuno. No íleo, as médias de TNFa e IFNg dosadas nos grupo $MPTiO_2$ ($p = 0,029$; $p = 0,032$) e $NPTiO_2$ ($p = 0,027$; $p = 0,037$) foram estatisticamente maiores que as médias apresentadas pelo grupo controle. A média de IL-12 foi estatisticamente maior que o controle apenas no grupo $MPTiO_2$ ($p = 0,032$).

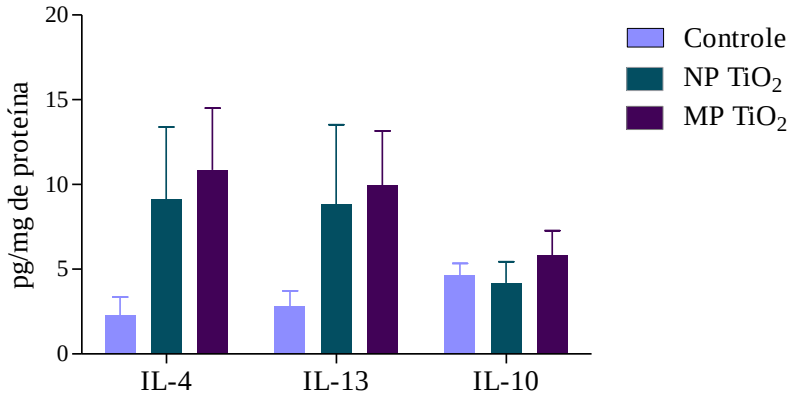

Figura 6 - Média e EPM da concentração de citocinas relacionadas à resposta imune do tipo Th2 no jejuno de acordo com os grupos

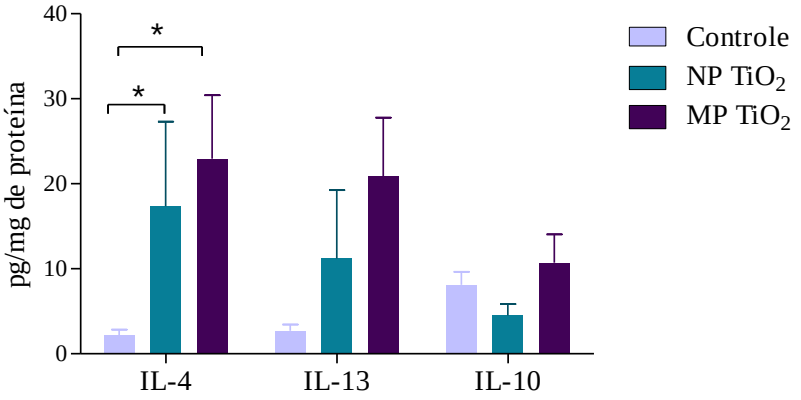

Figura 7 - Média e EPM da concentração de citocinas relacionadas à resposta imune do tipo Th2 no íleo de acordo com os grupos

* $p < 0,05$ para o teste de comparação de pares

Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos com relação às citocinas tipo Th2 (IL-4, IL-13 e IL-10) quantificadas no jejuno (Fig. 6). As médias de IL-4 quantificadas no íleo (Fig. 7) nos grupos $MPTiO_2$ ($p = 0,039$) e $NPTiO_2$ ($p = 0,026$) foram maiores que as médias apresentadas pelo grupo controle. Não houve diferença significativa entre os grupos $MPTiO_2$ *vs* $NPTiO_2$.

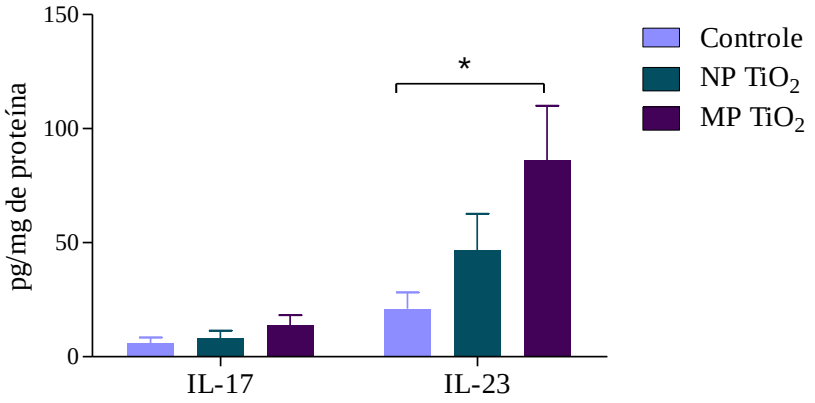

Figura 8 - Média e EPM da concentração de citocinas relacionadas à resposta imune do tipo Th17 no jejuno de acordo com os grupos

* $p < 0,05$ para o teste de comparação de pares

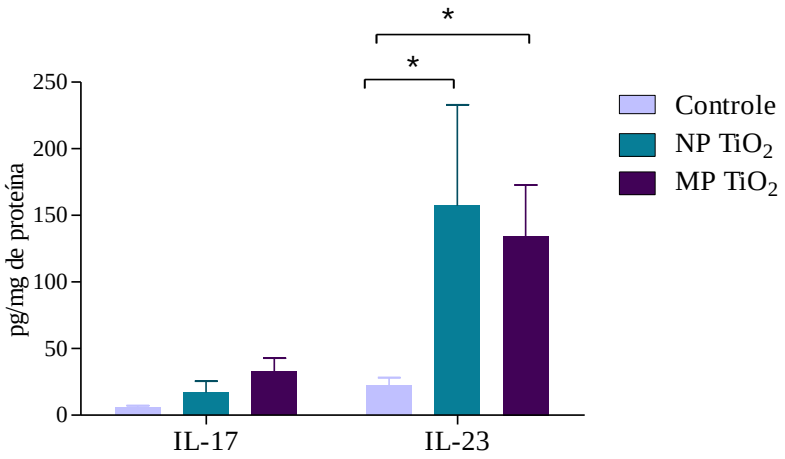

Figura 9 - Média e EPM da concentração de citocinas relacionadas à resposta imune do tipo Th17 no íleo de acordo com os grupos

* $p < 0,05$ para o teste de comparação de pares

Quanto à concentração de citocinas relacionadas com o padrão de resposta Th17, observou-se apenas aumento estatisticamente significativo de IL-23. No jejuno, foi observado aumento apenas no grupo $MPTiO_2$ ($p = 0,038$) em relação ao grupo controle. No íleo, ambos os grupos apresentaram maior média de IL-23 com relação ao grupo controle ($p = 0,034$ para $MPTiO_2$; $p = 0,009$ para $NPTiO_2$). Não foi constatada diferença estatística entre os grupos $MPTiO_2$ *vs* $NPTiO_2$.

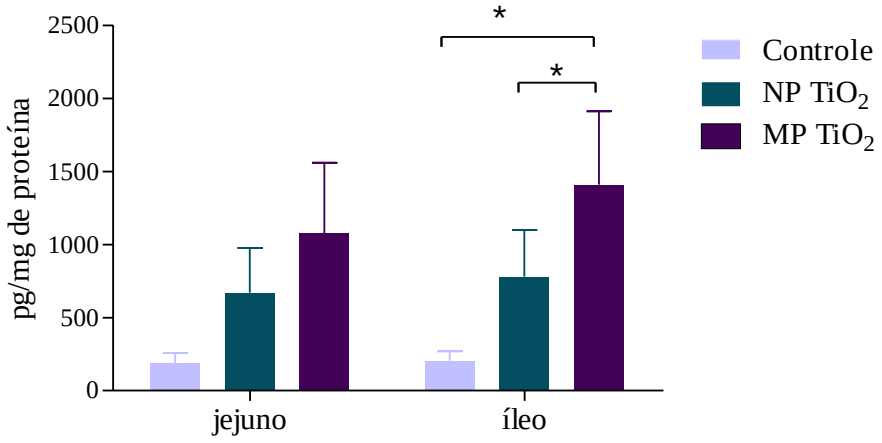

Figura 10 - Média e EPM da concentração de TGFb no jejuno e íleo de acordo com os grupos

* $p < 0,05$ para o teste de comparação de pares

As médias de TGFb foram maiores nos grupos que receberam TiO_2 com relação ao controle; porém, apenas no íleo ($p = 0,037$ para $MPTiO_2$ e $p = 0,036$ para $NPTiO_2$). Seguindo o quadro observado com relação às demais citocinas analisadas, não houve diferença estatística entre os grupos $MPTiO_2$ *vs* $NPTiO_2$.

Em suma, a concentração média de todas as citocinas foi maior nos grupos que receberam NP e $MPTiO_2$, quando em comparação ao grupo controle. Contudo, esse resultado foi estatisticamente significativo apenas para as citocinas IL-12, TNFa, IFNg, IL-4, IL-23 e TGFb. Com relação à região do intestino, o aumento de citocinas foi mais expressivo no íleo.

5. Infiltração de células inflamatórias

As células T CD4 e T CD8 positivas, *Natural Killers* (NK) e células dendríticas ($S100^+$) foram quantificadas em cortes transversais de duodeno, jejuno e íleo.

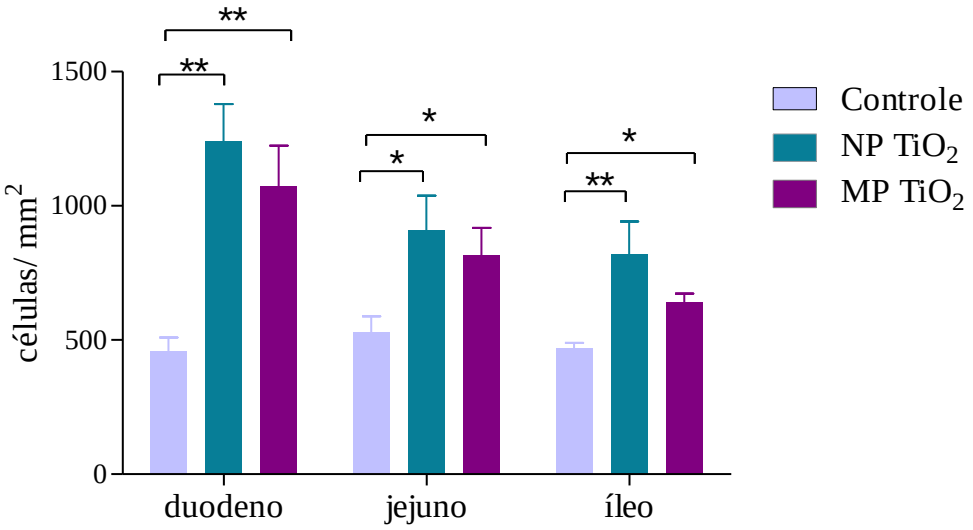

Figura 11 - Média e EPM de células T $CD4^+$ no duodeno, jejuno e íleo de acordo com os grupos

* $p < 0,05$ para o teste de comparação de pares
** $p < 0,01$ para o teste de comparação de pares

Com relação à infiltração de células inflamatórias no tecido, observamos aumento, estatisticamente significativo, de células T $CD4^+$ no duodeno, jejuno e íleo nos grupos que receberam TiO_2, quando em comparação ao grupo controle (Fig. 11). Esse aumento parece ter sido mais expressivo no duodeno. Não foi encontrada diferença significativa quanto à média de células T $CD4^+$ entre os grupos $MPTiO_2$ *vs* $NPTiO_2$.

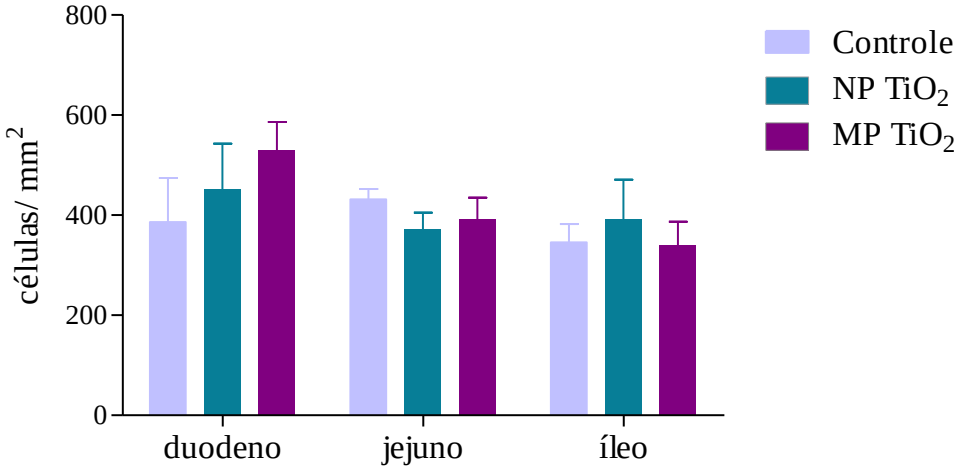

Figura 12 - Média e EPM de células T $CD8^+$ no duodeno, jejuno e íleo de acordo com os grupos

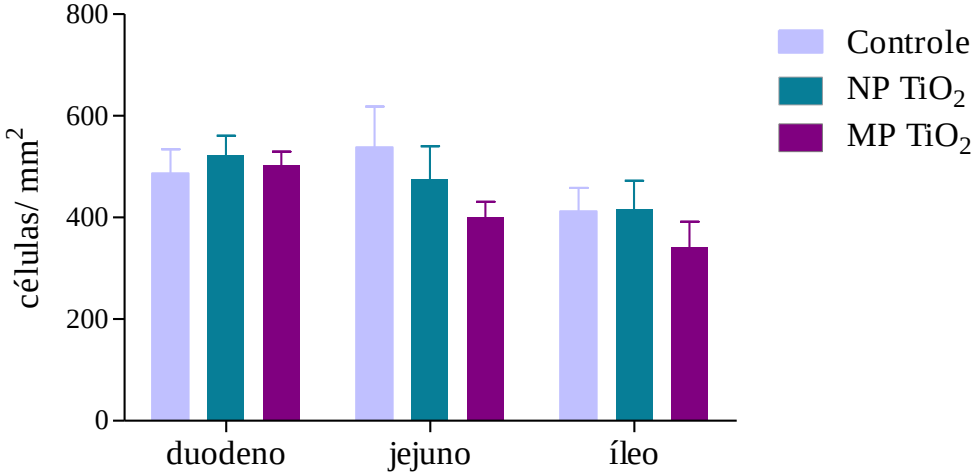

Figura 13 - Média e EPM de células NK no duodeno, jejuno e íleo de acordo com os grupos

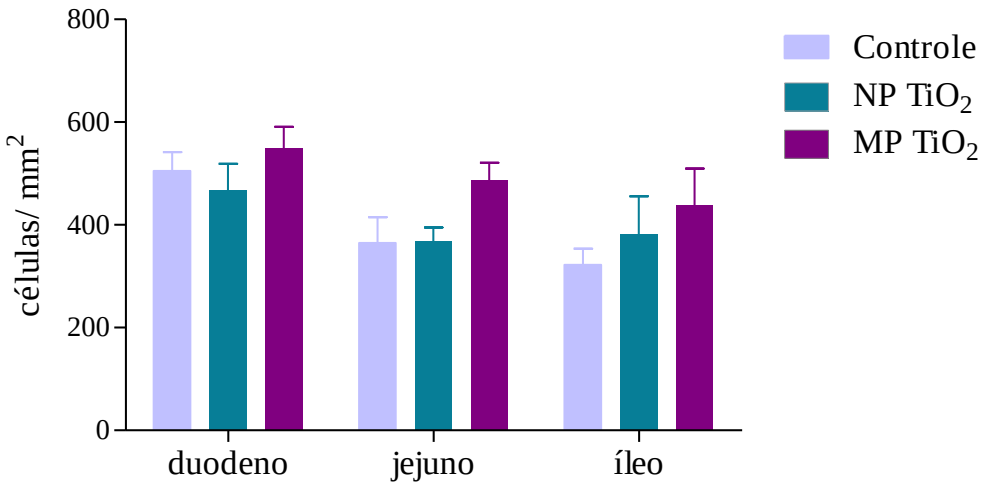

Figura 14 - Média e EPM de células dendríticas no duodeno, jejuno e íleo de acordo com os grupos

De acordo com os resultados ilustrados pelas Figuras 12 a 14, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos com relação à média de células T $CD8^+$, NK e células dendríticas no duodeno, jejuno e íleo.

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

1. Presença de TiO_2 no intestino delgado

A presença de titânio no tecido dos animais submetidos ao tratamento com TiO_2 foi confirmada pela técnica de ICP-AES. Esse teste foi realizado com o intuito de garantir a eficácia do tratamento e verificar se o grupo controle não apresentava titânio no tecido. Os resultados (Tabela 4) demonstram que o tratamento com TiO_2 foi capaz de promover a captação de partículas pelo intestino delgado e que o grupo controle não apresentou quantidades detectáveis de titânio no tecido. A absorção de partículas de TiO_2 pelo intestino de ratos já havia sido relatada por outros autores (Jani e col. 1994).

Comparativamente, a quantidade de titânio presente nos animais que receberam TiO_2 na forma de nanopartículas foi maior que nos animais tratados com micropartículas. Tais resultados podem indicar diferenças com relação à absorção de partículas pelo intestino, de acordo com seu tamanho, e estão em concordância com o relato de outros autores de que partículas menores são absorvidas em maior escala que partículas maiores (Kreuter 1991; Florence 1997).

2. Peso corpóreo

A perda ponderal observada nos animais que receberam TiO_2 pode ser em função da presença de inflamação no intestino delgado, a qual foi demonstrada pelo aumento de citocinas e células T $CD4^+$ no tecido, e que poderia afetar o estado geral do animal, bem como possivelmente a absorção de nutrientes pelo intestino. Entretanto, não podemos determinar o que gerou a perda de peso, pois não avaliamos alterações na quantidade de ração consumida pelos animais, bem como a

perda de nutrientes nas fezes, ao longo do tratamento. Além da perda de peso, não foram encontrados outros os sinais de inflamação durante o tratamento, tais como diarréia e sangue nas fezes.

3. Avaliação histopatológica

A principal alteração histopatológica encontrada nos animais expostos ao TiO_2 foi a presença de hipertrofia e hiperplasia do epitélio intestinal, a qual não foi observada nos animais do grupo controle. A presença de hiperplasia representa um mecanismo de defesa do epitélio a algum estímulo externo, tais como patógenos (Johnson e Bartold 1979), ou agressão, no qual ocorre reposição das células infectadas ou agredidas por células novas. Outros autores já haviam relatado presença de hiperplasia e hipertrofia do epitélio no pulmão de ratos (Heinrich e col. 1995; Everitt e col. 2000; Bermudez e col. 2004; Kobayashi e col. 2009), e camundongos e hamsters (Everitt e col. 2000) expostos ao TiO_2. Heinrich e col. (1995) observaram hiperplasia do epitélio broncoalveolar e fibrose intersticial leve em ratos expostos a nanopartículas de TiO_2 por 2 anos. Everitt e col. (2000) encontraram hipertrofia e hiperplasia no epitélio alveolar em ratos, camundongos e hamsters expostos a micropartículas de TiO_2 por treze semanas.

Com relação a alterações observadas por outros autores no intestino, Federici e col. (2007) relataram patologia da mucosa intestinal, a qual foi caracterizada por erosão dos vilos, e fusão e vacuolação na mucosa, em trutas submetidas à exposição oral de nanopartículas de TiO_2 por 14 dias.

4. Resposta Inflamatória

Para avaliar os efeitos de partículas de TiO_2 exercidos sobre a resposta imune no intestino delgado, foram avaliadas a infiltração de células inflamatórias no tecido, bem como a produção de citocinas no jejuno e íleo.

Observou-se aumento significativo de células T $CD4^+$ nas três regiões do intestino estudadas (duodeno, jejuno e íleo) nos grupos $MPTiO_2$ e $NPTiO_2$ com relação ao grupo controle. O aumento de células T CD4, por si só, representa um parâmetro indicador de uma resposta pró-inflamatória provocada pelas partículas de TiO_2 no intestino. A proliferação de células T $CD4^+$ em resposta à exposição à nanopartículas de TiO_2 já foi relatada por Shanem e col. (2009) em estudo conduzido em modelo de resposta imune humana *in vitro* (*in vitro human immune construct*).

Com relação à produção de citocinas, avaliamos o perfil de citocinas relacionadas ao padrão de resposta imune do tipo Th1, Th2 e Th17. Os resultados (Figuras 2 a 10) demonstram que houve maior concentração de citocinas no intestino dos animais que receberam TiO_2. O grupo tratado com $MPTiO_2$ apresentou aumento estatisticamente significativo das citocinas IFNg e IL-23 no jejuno e de IL-12, TNFa, IFNg, IL-4, IL-23 e TGFb no íleo. O grupo que recebeu $NPTiO_2$ apresentou aumento das citocinas TNFa, IFNg, IL-4, IL-23 e TGFb somente no íleo.

Os grupos que receberam TiO_2 demonstraram aumento das citocinas IL-12, TNFa e IFNg, as quais estão envolvidas com um padrão de resposta imune do tipo Th1. Observamos também aumento significativo de IL-23, a qual é considerada a citocina chave para que haja produção de IL-17 pelas células T helper 17 (Th17)

(Kobayashi e col. 2008). No entanto, não observamos aumento, estatisticamente significativo, de IL-17 nos animais que receberam TiO_2, apenas aumento de IL-23. Possivelmente, o tempo de tratamento com TiO_2 não tenha sido suficiente para observarmos um aumento significativo de IL-17 no intestino dos animais. Alternativamente, o aumento de TGFb pode ter promovido a diferenciação de células T *naive* em células T regulatórias (Treg), o que explicaria o aumento não significativo de IL-17. Em modelos murínicos, a diferenciação das células T *naive* em Treg ou em Th17 requer TGFb; porém, para que haja a diferenciação em células Th17 é necessário haver, também, a presença de IL-6 (Bettelli e col. 2006; Veldhoen e col. 2006) . Como não foi encontrado aumento significativo de IL-6 no tecido, apenas de TGFb, podemos especular que a promoção de células Th17 tenha sido menos importante, ou suprimida pela produção de Treg. Com base apenas em nossos dados, não podemos afirmar que não aconteceu uma resposta de padrão Th17, ou que ela tenha sido suprimida, uma vez que não avaliamos as células Th17 e/ou Treg no tecido.

Por outro lado, estudos recentes sugerem que a IL-23 é capaz de estimular mecanismos envolvidos com a resposta imune inata e produzir inflamação intestinal independentemente de seu papel em promover uma resposta celular Th17 (Maloy 2008, Iczue e col. 2008).

Com base em nossos achados, podemos inferir que o TiO_2 provocou uma resposta pró-inflamatória no intestino delgado, a qual parece ser predominantemente do tipo Th1. Alguns estudos que investigaram os efeitos de partículas de TiO_2 sobre a resposta inflamatória no pulmão de camundongos relataram a presença de um padrão de resposta do tipo Th2 (Larsen e col. 2009;

Park e col. 2009). Contudo, a resposta gerada pela exposição de TiO_2 pode se apresentar de formas distintas de acordo com determinado órgão ou sistema, e desse modo a resposta observada no intestino pode diferir da resposta originada no trato respiratório.

É importante também destacar que encontramos uma resposta inflamatória de forma mais expressiva no íleo. Tal achado poderia estar relacionado com a maior concentração de células M nessa região, as quais representam uma das principais vias de absorção de partículas no intestino (Kreuter 1991; Florence 1997). Li e col. (2009) observaram maior absorção de nanopartículas lipídicas no íleo e cólon de ratos quando em comparação aos demais segmentos do intestino, reforçando assim a importância da via de captação de partículas representada pelas células M nas Placas de Peyer. Ao considerarmos o íleo uma das principais regiões de absorção de partículas, seria esperado encontrarmos um processo inflamatório mais importante nessa região.

5. Efeitos de micropartículas vs nanopartículas de TiO_2

A maioria dos estudos relacionados a partículas de TiO_2 investigaram seus efeitos sobre o trato respiratório ou foram conduzidos *in vitro*, e indicam que, na mesma dosagem, partículas menores provocam efeitos mais importantes que partículas maiores (Ferin e col. 1990, Ferin e col. 1992, Donaldson e col. 1998, Oberdörster e col. 1992, 1994; Renwick e col. 2004, Kobayashi e col. 2009). Uma vez que estudos experimentais *in vivo* envolvendo a exposição do trato gastrointestinal aos efeitos adversos do TiO_2 ainda são limitados, consideramos pertinente avaliar o potencial inflamatório de partículas de TiO_2 sobre o intestino

delgado, bem como verificar se o maior potencial inflamatório de nanopartículas *vs* micropartículas relatado na literatura seria também observado no intestino. No entanto, nossos resultados não estão em concordância com esses achados, pois não encontramos diferenças estatisticamente significativas entre o grupos tratado com $MPTiO_2$ em comparação ao grupo que recebeu $NPTiO_2$, com relação a nenhum dos parâmetros aqui avaliados, tais como perfil de citocinas e infiltração de células inflamatórias no tecido. Embora a média de citocinas tenha se mostrado mais importante no grupo $MPTiO_2$ que no grupo $NPTiO_2$, não houve significância estatística ao compararmos os dois grupos.

Por outro lado, outros estudos comparando os efeitos entre partículas finas e ultrafinas de TiO_2 no pulmão de ratos, também não relataram diferenças significativas com relação ao tamanho das partículas (Borm e col. 2000; Hohr e col. 2002; Rehn e col. 2003, Sayes et. al 2006; Warheit et al. 2006).

6. Considerações finais

De acordo com os dados aqui apresentados, podemos inferir que o TiO_2 foi capaz de induzir uma resposta pró-inflamatória no intestino delgado dos camundongos. Essa resposta ocorreu tanto pelo aumento de células T CD4 positivas bem como pelo aumento de citocinas pró-inflamatórias. Nossos resultados reafirmam o efeito pró-inflamatório do TiO_2 relatado em diversos estudos (Borm e col. 2000; Haar e col. 2006; Ashwood e col. 2007; Larsen e col. 2009; Park e col. 2009; Shanem e col. 2009).

Perspectivas para novos estudos

Nossos resultados apontam para um padrão de resposta imune provocado pelo TiO_2 no intestino que ainda não foi descrito na literatura, o que salienta a contribuição científica de nosso experimento. Entretanto, ainda temos muitas lacunas a serem esclarecidas, tais como o comportamento e expressão de células Th17 e Treg no intestino após sua exposição a essas partículas. Seria interessante também alterar o protocolo experimental com relação à dose e ao período de tratamento, verificando se os efeitos pró-inflamatórios do TiO_2 são mais evidentes em doses maiores, ou após um maior período de exposição, além de verificar também se o processo inflamatório persiste após o término do tratamento. Outra questão pertinente seria a utilização de um modelo de colite experimental, avaliando os efeitos de partículas de TiO_2 sobre o intestino já inflamado, verificando se elas poderiam agravar o processo inflamatório já instalado.

CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

De acordo com os resultados apresentados, podemos concluir:

1. O TiO_2 provocou uma resposta pró-inflamatória, predominantemente do tipo Th1, no intestino delgado dos animais, tanto na forma de micropartículas, bem como na forma de nanopartículas. Esse efeito foi mais importante no íleo;
2. Não foram encontradas alterações histopatológicas significativas no intestino delgado dos animais que receberam TiO_2, comparativamente ao grupo controle;
3. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os efeitos pró-inflamatórios provocados pelas nanopartículas em comparação aos efeitos causados pelas micropartículas de TiO_2 ;

ANEXOS

ANEXO-1 Aprovação do Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

HC HOSPITAL DAS CLÍNICAS

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 14/11/2007, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0582/07**, intitulado: "**AÇÃO DAS MICRO E NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO SOBRE A RESPOSTA INFLAMATÓRIA NO INTESTINO DE CAMUNDONGOS**" apresentado pelo Departamento de **GASTROENTEROLOGIA**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra 'c').

Pesquisador (a) Responsável: **Dr. Aylan Miranda Sipahi**

Pesquisador (a) Executante: **Carolina Maciel Nogueira**

CAPPesq, 22 de Novembro de 2007

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 255 6º Andar – CEP 05403-010 - São Paulo - SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6452 e-mail: capppesq@hcnet.usp.br / secretaria.capppesq@hcnet.usp.br

REFERÊNCIAS

Referências

Ashwood P, Thompson RPH, Powell JJ. Fine particles that adsorb lipopolysaccharide *via* bridging calcium cations may mimic bacterial pathogenicity towards cells. *Exp Biol Med* 2007; 232: 107-117.

Bermudez E, Mangum JB, Wong BA et al. Pulmonary Responses of Mice, Rats, and Hamsters to Subchronic Inhalation of Ultrafine Titanium Dioxide Particles. *Toxicological Sciences* 2004; 77: 347–357.

Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 2006;441:235–8.

Borm PJA, Hohr D, Steinfartz Y et al. Chronic inflammation and tumor formation in rats after intratracheal instillation of high doses of coal dusts, titanium dioxides, and quartz. *Inhalation Toxicology* 2000; 12 (supll 3): 225–231.

Borm PJA, Robbins D, Haubold S et al. The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC. *Particle and Fibre Toxicology* 2006; 3:11.

Brand S. Crohn's disease: Th1, Th17 or both? The change of a paradigm: new immunological and genetic insights implicate Th17 cells in the pathogenesis of Crohn's disease. *Gut* 2009; 58: 1152-1167

Chen HW, Su SF, Chien CT et al. Titanium dioxide nanoparticles induce emphysema-like lung injury in mice. *The Faseb Journal Express* 2006, fj.06-6485fje.

Coppi G, Bondi M, Coppi A. Toxicity and gut associated lymphoid tissue translocation of polymyxin B orally administered by alginate/chitosan microparticles in rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2008; 60: 21–26

Discroll KE, Maurer JK, Lindenschmidt RC et. al. Respiratory tract responses to dust: Relantionship between dust, burden, lung injury, alveolar macrophage fibronectin release, and the development of pulmonary fibrosis. *Toxicology and Applied Pharmacology* 1990. 106:88-101.

Donaldson K, Li XY, Macnee W. Ultrafine (nanometer) particle mediated lung injury. *J Aerosol Sci.* 1998; 29 (5/6): 553-560.

Evans SM, Ashwood P, Warley A. et al. The role of dietary microparticles and calcium in apoptosis and interleukin-1β release of intestinal macrophages. *Gastroenterology* 2002; 123:1543–1553.

Everitt JI, Mangum JB, Bermudez E, Wong BA, Asgharian B, Reverdy EE, Hext PM, Warheit DB. Comparison of selected pulmonary responses of rats, mice and Syrian golden hamsters to inhaled pigmentary titanium dioxide. *Inhal Toxicol.* 2000; *12*(Suppl 3):275–282.

Federici G, Shaw BJ, Handy RD. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (Oncorhynchus mykiss): gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. *Aquat Toxicol* 2007;84:415–30.

Ferin J, Oberdorster G, Penney DP et al. Increased pulmonary toxicity of ultrafine particles? I. Particle clearance, translocation, morphology. *J Aerosol Sci*. 1990; 21: 381-384.

Ferin J, Oberdorster G, Penney DP. Pulmonary retention of ultrafine and fine particles in rats. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1992; 6: 535-542.

Florence AT. The oral absorption of micro and nanoparticulates: neither exceptional nor unusual. *Pharmaceutical Research* 1997; 14 (3): 259-266.

Haar C, Hassing I, Bol M, Bleumink R, Pieters R. Ultrafine but not fine particulate matter causes airway inflammation and allergic airway sensitization to co-administered antigen in mice. *Clinical and Experimental Allergy* 2006; 36:1469-1479.

Heinrich U, Fuhst R, Rittinghausen S, Creutzenberg O, Bellmann B, Koch W, Levsen K [1995]. Chronic inhalation exposure of Wistar rats and 2 different strains of mice to diesel-engine exhaust, carbon black, and titanium dioxide. *Inhal Toxicol.* 1995*; 7*(4):533–556.

Hext PM, Tomenson JA, Thompson P. Titanium Dioxide: Inhalation toxicology and epidemiology. *Ann. occup. Hyg*. 2005 ; 49 (6): 461–472.

Hohr D, Steinfartz Y, Schins RPF, Knaapen AM, Martra G et al. The surface area rather than the surface coating determines the acute inflammatory response after instillation of fine and ultrafine TiO_2 in the rat. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 2002; 205: 239-244.

Izcue A, Hue S, Buonocore S, Arancibia-Cárcamo CV, Ahern PP, Iwakura Y, Maloy KJ, Powrie F. Interleukin-23 restrains regulatory T cell activity to drive T cell-dependent colitis. Immunity 2008; 28(4):559-70.

Inoue K, Takano H, Yanaguisawa R et.al. Effects of Airway Exposure to Nanoparticles on Lung Inflammation Induced by Bacterial Endotoxin in Mice. *Environmental Health Perspectives* 2006; 114 (9): 1325-30.

Jani PU, McCarthy DE, Florence AT. Titanium dioxide (rutile) particles uptake from the rat GI tract and translocation to systemic organs after oral administration. *Int J Pharm* 1994; 105, 157-168.

Jin CY, Zhu BS, Wang XF, Lu QH. Cytotoxicity of titanium dioxide nanoparticles in mouse fibroblast cells. *Chem. Res. Toxicol.* 2008; 21(9):1871-7.

Kim KT, Klaine SJ, Cho J et. al. Oxidative stress responses of Daphnia magna exposed to TiO_2 nanoparticles according to size fraction. *Science of the Total Environment* 2010; 408: 2268–2272.

Kobayashi T, Okamoto S, Hisamatsu T, et. al. IL23 differentially regulates the Th1/Th17 balance in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut* 2008; 57: 1682-1689.

Kobayashi N, Naya M, Endoh S et. al. Comparative pulmonary toxicity study of nano-TiO2 particles of different sizes and agglomerations in rats: Different short- and long-term post-instillation results. *Toxicology* 2009, 264: 110–118.

Kreuter J. Peroral administration of nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1991; 7: 71-86

Larsen ST, Roursgaard M, Jensen KA, Nielsen GD. Nano titanium dioxide particles promote allergic sensitization and lung inflammation in mice. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 2009; 106: 114-117

Li H, Zhao X, Ma Y et. al. Enhancement of gastrointestinal absorption of quercetin by solid lipid nanoparticles. *Journal of Controlled Release* 2009. 133:238-44.

Lomer MCE, Harvey RSJ, Evans SM, Thompson RPH, Powell JJ Efficacy and tolerability of a low microparticle diet in a double blind, randomized, pilot study in Crohn's disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001; 13: 101–106.

Lomer MCE, Thompson RPH, Powell JJ. Fine and ultrafine particles of the diet: influence on the mucosal immune response and association with Crohn's disease. *Proceedings of the Nutrition Society* 2002; 61: 123–130.

Lomer MCE, Hutchinson C, Volkert S et al. Dietary sources of inorganic microparticles and their intake in healthy subjects and patients with Crohn`s disease. *British Journal of Nutrition* 2004; 92: 947-55.

Lomer MCE, Grainger SL, Ede R, Catterall AP et al. Lack of efficacy of a reduced microparticle diet in a multi-centred trial of patients with active Crohn's disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005; 17:377–384.

Ma L, Zhao J, Wang J et. al. The Acute Liver Injury in Mice Caused by Nano-Anatase TiO_2. *Nanoscale Res Lett* 2009; 4:1275–1285.

Madl AK, Pinkerton KE. Health effects of inhaled engineered and incidental nanoparticles. Crit Rev Toxicol. 2009; 39(8):629-58.

Mahmud N, Weir DG. The urban diet and Crohn's disease: is there a relationship? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001; 13 (2):93-95.

Maloy KJ. The Interleukin-23 / Interleukin-17 axis in intestinal inflammation *Journal of Internal Medicine* 2008; 263: 584–590

NIOSH. Current intelligence bulletin: Evaluation of health hazard and recommendations for occupational exposure to titanium dioxide (draft).Atlanta, GA: National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH), Centers for Disease Control & Prevention, Department of Human and Health Services 2005.

Oberdörster G, Ferin J, Gelein R, Soderholm S et al. Role of the alveolar macrophage in lung injury: studies with ultrafine particles. *Environ Health Perspect* 1992; 97: 193-199.

Oberdörster G, Ferin J, Lehnert BE. Correlation between particle size, in vivo particle persistence, and lung injury**.** *Environ Health Perspect* 1994; 102 (Suppl 5): 173-179.

Park E-J, Yoon J, Choi K, Yi J, Park K. Induction of chronic inflammation in mice treated with titanium dioxide nanoparticles by intratracheal instillation *Toxicology* 2009; 260:37–46

Peters K, Unger RE, Kikpatrick CJ et al. Effects of nano-scaled particles on endothelial cell function *in vitro*: Studies on viability, proliferation and inflammation. *J Mater Sci Mater Med* 2004; 15: 321-325.

Powell JJ, Harvey RSJ, Ashwood P et al. Immune Potentiation of Ultrafine Dietary Particles in Normal Subjects and Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Journal of Autoimmunity* 2000; **14:** 99–105.

Ramsden CS, Smith TJ, Shaw BJ, Handy RD. Dietary exposure to titanium dioxide nanoparticles in rainbow trout, (Oncorhynchus mykiss): no effect on growth, but subtle biochemical disturbances in the brain. Ecotoxicology 2009; 18:939–951.

Rehn B, Seiler F, Rehn S, Bruch J, Maier M. Investigations on the inflammatory and genotoxic lung effects of two types of titanium dioxide: untreated and surface treated. *Toxicol Appl Pharmacol* 2003; 189: 84-95.

Renwick LC, Brown D, Clouter A, Donaldson K. Increased inflammation and altered macrophage chemotatic responses caused by two ultrafine particle types. *Occup Environ Med* 2004; 61: 442-447.

Robichaud CG, Tanzil D, Weilenmann U, Wiesner M. Relative risk analysis of several manufactured nanomaterials: an insurance industry context. *Environ. Sci. Technol.* 2005; 39: 8985-8994.

Sayes CM, Wahi R, Kurian PA, Liu Y, West JL, Ausman KD, Warheit DB, Colvin VL. Correlating nanoscale titania structure with toxicity: A cytotoxicity and inflammatory response study with human dermal fibroblasts and human lung epithelial cells. Toxicol Sci. 2006; 92:174–185.

Schanen BC, Karakoti AS, Seal Sudipta et.al. Exposure to titanium dioxide nanomaterials provokes inflammation of an *in vitro* human immune construct. *ACS Nano* 2009; 3: 2523-32

Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*.2006;24:179–89.

Wang JJ, Sanderson BJS, Wang He. Cyto- and genotoxicity of ultrafine TiO_2 particles in cultured human lymphoblastoid cells. *Mutation Research* 2007a; 628: 99–106

Wang J, Zhou G, Chen C et. al. Acute toxicity and biodistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration.*Toxicology Letters* 2007b; 168: 176–185

Wang L, Nagesha DK, Selvarasah S, Dokmeci MR, Carrier RL. Toxicity of CdSe Nanoparticles in Caco-2 Cell Cultures. *Journal of Nanobiotechnology* 2008, 6:11

Wang J, Li N, Zheng L et al. P38-Nrf-2 signaling pathway of oxidative stress in mice caused by nanoparticulate TiO_2. *Biol Trace Elem Res* 2010. DOI 10.1007/s12011-010-8687-0.

Warheit DB, Webb TR, Sayes CM, Colvin VL, Reed KL. Pulmonary instillation studies with nanoscale TiO_2 rods and dots in rats: Toxicity is not dependent upon particle size and surface area. Toxicol Sci 2006; 91:227–236.

Warheit DB, Hoke RA, Finlay C et al. Development of a base set of toxicity tests using ultrafine TiO2 particles as a component of nanoparticle risk management. *Toxicology Letters* 2007;171:99–110.