

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação da toxicidade de nanopartículas de dióxido de titânio (TiO₂) e possível efeito protetor do selênio em ratos *Wistar*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para a obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Toxicologia

Orientada: Cecília Cristina de Souza Rocha

Orientador: Prof. Dr. Fernando Barbosa Júnior

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia em 01/03/2018. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2018

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.

Rocha, Cecília Cristina de Souza

Avaliação da toxicidade de nanopartículas de dióxido de titânio (TiO₂) e possível efeito protetor do selênio em ratos *Wistar*. Ribeirão Preto, 2018. 40p.: il.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia.

Orientador: Barbosa Júnior, Fernando.

1. Nanopartículas 2. Dióxido de titânio 3. Selênio de ação 4.
Genotoxicidade 5. Estrese Oxidativo

FOLHA DE APROVAÇÃO

Cecília Cristina de Souza Rocha

Avaliação da toxicidade de nanopartículas de dióxido de titânio (TiO₂) e possível efeito protetor do selênio em ratos *Wistar*.

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Toxicologia para obtenção do Título de
Mestre em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia

Orientador: Prof. Dr. Fernando Babosa
Júnior

Aprovado em: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof (a). Dr (a).: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof (a). Dr (a).: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof (a). Dr (a).: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof (a). Dr (a).: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico aos meus pais, José Divino e Eliana, e à minha irmã Nathália. O apoio de vocês foi fundamental para a realização deste trabalho.

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr. Fernando Barbosa Junior, pelo incentivo e confiança em meu trabalho, pelas palavras amigas nos momentos difíceis e por todo conhecimento adquirido nesse período;

À Universidade de São Paulo, à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, ao Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas e ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia, em especial a secretária Rosemary Ioshimine Gerolineto, por sempre ser prestativa;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro durante o desenvolvimento do Mestrado;

Ao Laboratório de Nutrigenômica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, em especial à Ana Rita Thomazela Machado e ao Rone Aparecido De Grandis, pela ajuda e suporte nas análises de genotoxicidade.

À Fundação Jorge Duprat Figueiredo de Segurança e Medicina do Trabalho (FUNDACENTRO) e ao Prof. Dr. Walter dos Reis Pedreira Filho, pela disponibilidade em colaborar com as análises por espectrometria de massas;

Ao Airton da Cunha Martins Junior e à Lara Ferreira Azevedo, grandes amigos e colaboradores do meu projeto. Obrigada por sempre estarem disponíveis e por toda ajuda durante o desenvolvimento do trabalho;

À técnica Vanessa Cristina de Oliveira Souza, do Laboratório de Toxicologia e Essencialidade de Metais, por todo suporte nas análises por espectrometria de massas, por sempre ter se mostrado disposta a me ensinar e sempre ter uma palavra de incentivo;

À técnica Maria Aparecida Buzeto pela disposição e ajuda nos experimentos;

Aos alunos e amigos do Laboratório de Toxicologia e Essencialidade de Metais: Ana Carolina Paulelli, Andréia Ávila, Bruno Rocha, Cibele Cesila, Deborah Moraes, Joseph Adeyemi, Maria Fernanda Carneiro, Mariana Lepri, Marília Oliveira, Matheus Gallimberti, Paula Devóz, Prycila Feitoza, Romena Sanglard, Silvana Ruella, Wellington Tavares e William Robert. Obrigada por tornarem essa jornada mais leve;

Aos meus pais, José Divino e Eliana e à minha irmã Nathália, por sempre me incentivarem e acreditarem nos meus sonhos. Nada disso seria possível sem o apoio e o amor de vocês;

Ao Robson Amaral, meu grande amigo e companheiro de jornada. Obrigada por sempre estar ao meu lado e dividir comigo as alegrias e incertezas da vida de pesquisador;

À Eduarda Romanini, Gabriela Rezende, Izabela Bettinassi, Juliana Ribeiro, Lucas Zupolini, Mayra Scanzani e Rafael Castro por terem se tornado minha segunda família e por sempre poder contar com o apoio de vocês;

Às amigas Beatriz Blasi, Letícia Gião, Marcella Azevedo e Patrícia Dominato, por serem um grande apoio e por sempre compartilharem de minhas alegrias;

Aos amigos Bruno Vieira, Caroline Alves, Dahyes Regasso, Eduardo Borges, Isabella Gobbo, Isadora Oliveira, João Paulo Ximenez, Letícia Corrêa, Mayara Camargo, Natália Pellison, Nayna Gomes e Paula Verzola pelas palavras de conforto e por sempre me incentivarem;

E a todos que mesmo não estando nestas linhas contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão desta etapa.

Muito obrigada!

“A ciência avança por causa da dúvida, não por causa da certeza. A certeza nos deixa onde já estávamos. A dúvida é que nos permite ir adiante”.

Mario Sergio Cortella

RESUMO

ROCHA, C.C.S. **Avaliação da toxicidade de nanopartículas de dióxido de titânio (TiO₂) e possível efeito protetor do selênio em ratos *Wistar***. 2018. 40f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Nanopartículas são estruturas que variam entre 1 e 100 nm e, devido a características como tamanho, área de superfície de contato e reatividade, são utilizadas em várias áreas, como saúde, energia, agricultura e área ambiental. Dentre as várias nanopartículas, destacam-se as de dióxido de titânio, as quais são amplamente utilizadas na indústria, e podem entrar no organismo por diferentes vias de exposição, sendo a absorção gastrintestinal a principal delas. A exposição às nanopartículas de dióxido de titânio vem sendo associadas à geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), dentre elas, o peróxido de hidrogênio. Alguns componentes celulares são alvo do dano oxidante mediado pelas EROs, como alterações no material genético e nas atividades enzimáticas. Porém, as células possuem sistemas de defesa enzimáticos que as protegem e mantem seu estado redox. As enzimas catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx) - uma selenoproteína, são exemplos dessa defesa. O selênio é um microelemento essencial na constituição das selenoproteínas, exercendo papel antioxidante. Dessa forma, o presente estudo objetivou avaliar possíveis efeitos protetores do selênio em ratos, quando co-expostos de forma sub-crônica com nanopartículas de dióxido de titânio. Para isso, ratos *Wistar*, machos, foram expostos à nanopartículas de dióxido de titânio (1,5 mg.kg⁻¹), por gavagem e ao selênio (6 mg.L⁻¹) na forma de selenato de sódio, na água de beber, durante sessenta dias. Os animais foram divididos em quatro grupos (n= 6): Grupo I (controle); Grupo II (nanopartículas de dióxido de titânio); Grupo III (nanopartículas de dióxido de titânio + selênio); Grupo IV (selênio). Após o período de exposição, os animais foram eutanasiados, e o sangue e órgãos foram retirados para análise da genotoxicidade, das atividades das enzimas catalase e GPx e deposição das nanopartículas e do selênio. Os resultados do estudo mostraram que a co-exposição com selênio (Grupo III) não alterou a concentração de titânio nos tecidos quando comparado ao grupo exposto apenas às nanopartículas de titânio (grupo II), porém, reduziu os danos ao DNA promovidos pelas nanopartículas de titânio (*Tail Intensity*), mostrando, assim, o papel do selênio na proteção da genotoxicidade induzida pelas nanopartículas.

Palavras-chave: nanopartículas, dióxido de titânio, selênio, genotoxicidade, estresse oxidativo.

ABSTRACT

ROCHA, C.C.S. **Evaluation of titanium dioxide nanoparticles (TiO₂) toxicity and possible protective effect of selenium in *Wistar* rats.** 2018. 40f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Nanoparticles are structures that range from one to 100 nm. Due to their size, superficial contact area and reactivity, they are utilized in several areas of health, energy, agriculture and environmental. Titanium dioxide nanoparticles stand out among others for they are widely employed in industry and can be incorporated in the organism by different exposure pathways, the gastrointestinal as the main one. Exposure to titanium dioxide nanoparticles has been associated with the generation of reactive oxygen species (ROS), such as hydrogen peroxide. Cellular components can be damaged by ROS, being examples some changes in genetic material and enzymatic activities. However, the cells own enzymatic defense systems that protect and maintain their redox state. The enzymes catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx) - a selenoprotein, are examples of this defense. Selenium is an essential microelement in selenoproteins and has an antioxidant role. In this context, the aim of the present study was to evaluate possible protective effects of selenium in rats sub-chronically co-exposed with titanium dioxide nanoparticles. Male Wistar rats were exposed to titanium dioxide nanoparticles (1.5 mg.kg⁻¹, per gavage) and selenium (6 mg.L⁻¹, in drinking water) in the form of sodium selenium, throughout sixty days. Animals were separated in four groups (n = 6): Group I (control); Group II (titanium dioxide nanoparticles); Group III (titanium dioxide nanoparticles + selenium); Group IV (selenium). After the exposure, the animals were euthanized and blood and organs were removed for analysis of genotoxicity, catalase and GPx activities and deposition of nanoparticles and selenium. The results demonstrated that co-exposure with selenium (Group III) did not alter the concentration of titanium in the tissues when compared to the group exposed only to titanium nanoparticles (group II). On the other hand, selenium reduced DNA damage promoted by titanium nanoparticles (Tail Intensity), showing the role of selenium in the protection of genotoxicity induced by nanoparticles.

Key words: nanoparticles, titanium dioxide, selenium, genotoxicity, oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Distribuição das nanopartículas de dióxido de titânio no organismo (Modificado de Hong; Zheng, 2016)..... 2
- Figura 2** - Ligação do titânio à molécula de DNA através do grupo fosfato (Zhu et al, 2017)..... 4
- Figura 3** - Microscopia eletrônica de transmissão (TEM) das nanopartículas de dióxido de titânio (Martins et al, 2017)..... 18
- Figura 4** - Variação da massa corporal dos animais tratados ou não com nanopartículas de dióxido de titânio e/ou selênio..... 19
- Figura 5** - Análise da concentração de titânio (A) e selênio (B) em amostras de cérebro, pulmão, rim e fígado de animais tratados ou não com nanopartículas de dióxido de titânio e/ou selênio..... 20
- Figura 6** - Porcentagem média de DNA na cauda (*Tail Intensity*) avaliada pelo ensaio cometa em amostras de fígado (A) e cérebro (B) dos animais tratados ou não com nanopartículas de dióxido de titânio e/ou selênio..... 23
- Figura 7** – Análise das atividades das enzimas catalase (A) e GPx (B) em amostras de sangue dos animais tratados ou não com nanopartículas de dióxido de titânio e/ou selênio..... 27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Microelementos presentes na ração fornecida animais.....	12
Tabela 2 - Condições Experimentais do ICP-MS.....	15
Tabela 3 - Caracterização das nanopartículas de dióxido de titânio	18

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAT	catalase
dDTNPs	desoxirribonucleotídeos fosfatados
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
EROs	espécies reativas de oxigênio
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
GPx	glutaciona peroxidase
GR	glutaciona redutase
GSH	glutaciona reduzida
GST	glutaciona S-transferase
Hb	hemoglobina
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
ICP-MS	espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente
IL-1β	interleucina-1 β
IL-6	interleucina-6
MDA	Malondialdeído
NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NPs	nanopartículas
OECD	<i>Organisation for Economic Cooperation and Development</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
SOD	superóxido dismutase
TiO₂ NPs	nanopartículas de dióxido de titânio
TMAH	hidróxido de tetrametilamônio
TNF-α	interferon- α
UV-VIS	ultravioleta-visível
Y	ítrio

LISTA DE SÍMBOLOS

\pm	mais ou menos
%	porcentagem
<	menor que
>	maior que
λ	lambda comprimento de onda, em nm
$^{\circ}\text{C}$	graus Celsius
Å	Angström
kV	kilovolts
mA	miliampére
mm	milímetros
mmol	milimolar
nm	nanometro
rpm	rotações por minuto
v/v	volume/volume
V	volts
W	watts
μmol	micromolar
Ar	argônio
H_2O_2	peróxido de hidrogênio
He	hélio
HNO_3	ácido nítrico
NaCl	cloreto de sódio
NaOH	hidróxido de sódio
NO	óxido nítrico
OH^-	radical hidroxil
TiO_2	dióxido de titânio

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de Figuras	iii
Lista de Tabelas	iv
Lista de abreviaturas e siglas	v
Lista de Símbolos	vi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Nanopartículas de dióxido de titânio e seus efeitos tóxicos.....	1
1.2. Genotoxicidade das nanopartículas de dióxido de titânio.....	3
1.3. Estresse oxidativo e defesa antioxidante.....	4
1.4. Selênio.....	5
2. HIPÓTESE	8
3. OBJETIVOS	9
3.1. Objetivo geral	9
3.2. Objetivos específicos	9
4. MATERIAL E MÉTODOS	10
4.1. Equipamentos e acessórios.....	10
4.2. Reagentes e soluções.....	10
4.3. Caracterização das nanopartículas de dióxido de titânio.....	10
4.4. Nanopartículas de dióxido de titânio.....	11
4.5. Selênio.....	11
4.6. Animais.....	12
4.7. Delineamento experimental.....	12
4.7.1 Escolha da dose das nanopartículas de dióxido de titânio e selênio.....	12
4.7.2 Tratamento dos animais.....	13
4.8. Eutanásia dos animais, retirada e armazenamento dos órgãos.....	13
4.9. Determinação de titânio e selênio por ICP-MS.....	13
4.10. Avaliação do dano ao DNA pelo Ensaio Cometa.....	15
4.11. Atividade da enzima catalase.....	16
4.12. Atividade da enzima glutathiona peroxidase.....	16
4.13. Determinação da hemoglobina.....	17
4.14. Análises estatísticas	17
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
5.1. Caracterização das nanopartículas de dióxido de titânio.....	18
5.2. Massa corporal dos animais.....	18
5.3. Determinação de titânio e selênio em amostras de tecidos dos animais.....	19

5.4. Avaliação da genotoxicidade das nanopartículas de dióxido de titânio em amostras de fígado e cérebro dos animais.....	23
5.5. Avaliação dos parâmetros redox em amostras de sangue dos animais.....	26
6. CONCLUSÃO.....	30
7. REFERÊNCIAS.....	31
ANEXO.....	41
ANEXO 1 - Aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP.....	41

1. INTRODUÇÃO

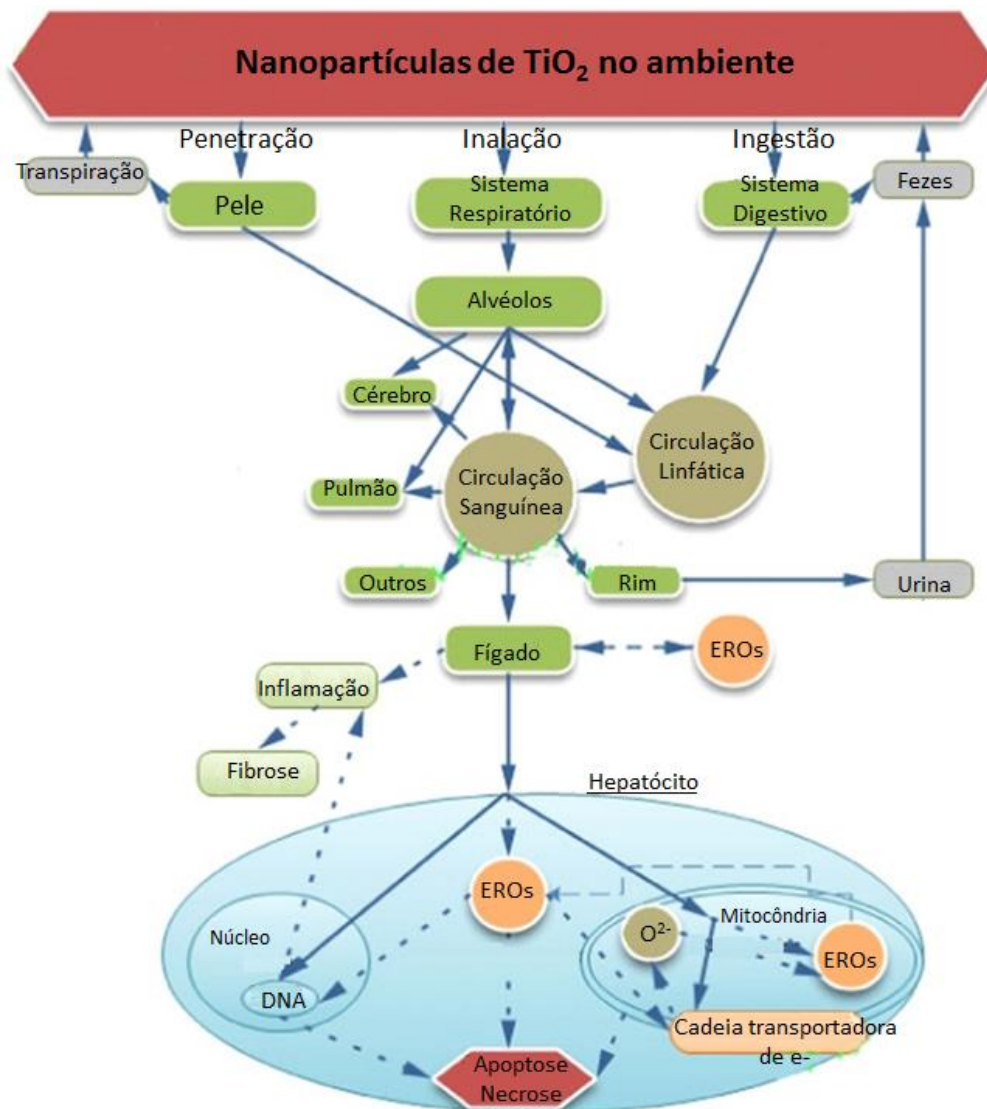
1.1 Nanopartículas de dióxido de titânio e seus efeitos tóxicos

Devido à características peculiares, tais como tamanho, área de superfície de contato, estrutura cristalina e reatividade, os nanomateriais (partículas que variam entre 1 e 100 nm em tamanho), são utilizados em várias áreas relacionadas à saúde, energia, proteção ambiental e agricultura nos últimos anos (PASCHOALINO et al, 2010; MASCIANGIOLI; ZHANG, 2003). Consequentemente, também é crescente a exposição humana (ocupacional e ambiental) à nanopartículas (NPs), tornando-se cada vez mais necessário o conhecimento de potenciais efeitos tóxicos associados à exposição, uma vez que estas NPs podem interagir com o sistema biológico gerando efeitos deletérios (CZAJKA et al, 2015). Muitos metais são utilizados como nanomateriais, tais como o ouro, prata, ferro entre outros (TIAN et al, 2016; HERZOG et al, 2013). Dentre as várias NPs, destacam-se as de dióxido de titânio (SHI et al, 2013; KULKARNI, 2015).

Nanopartículas de TiO_2 (TiO_2 NPs) vêm sendo amplamente utilizadas em várias áreas que incluem pinturas, embalagens de alimentos, cosméticos, creme dental, medicamentos e produtos farmacêuticos (SHI et al, 2013).

O TiO_2 pode entrar no organismo por diferentes vias de exposição, como sistema respiratório, digestivo ou pele, circula através do sangue e sistema linfático, sendo distribuído para diferentes órgãos (Figura 1) (HONG; ZHANG, 2016). Por ser utilizado como aditivo em creme dental, cápsulas e carreadores de fármacos, a absorção gastrointestinal é a principal via de exposição (CZAJKA et al, 2015).

Figura 1- Distribuição das nanopartículas de dióxido de titânio no organismo



A linha sólida representa o meio pelo qual as TiO_2 NPs entram no organismo; a linha tracejada representa as reações bioquímicas estimuladas pelas TiO_2 NPs. Fonte: modificado de Hong; Zheng, 2016.

Embora muito utilizado, alguns estudos já apontam para efeitos citotóxicos, fitotóxicos, ecotóxicos e genotóxicos das TiO_2 NPs (GOTTSCHALK et al, 2013; JOSKO; OLESZCZUK, 2014; ZHAO et al, 2013).

Ghosh e colaboradores (2013) observaram que as TiO_2 NPs reduzem a atividade de desidrogenases em mitocôndrias de linfócitos humanos, porém não alteram a integridade da membrana. Além disso, estas partículas são capazes de induzir apoptose e causar dano ao DNA. Características de morte celular por apoptose em células epiteliais brônquicas também foram observadas por Hussain e colaboradores (2010), no qual células expostas à TiO_2 NPs apresentaram diminuição

de tamanho, condensação da cromatina periférica, formação de corpos apoptóticos, ativação de caspases e fragmentação do DNA, bem como peroxidação lipídica e desestabilização da membrana lisossomal.

Além disso, as TiO₂ NPs podem se depositar no ovário, resultando em perda relativa da massa desse órgão e de fertilidade, alterações hematológicas, séricas, nos níveis de hormônios sexuais, inflamações e necrose. Zhao e colaboradores (2013) sugerem que a redução da fertilidade e a lesão nos ovários após a exposição às TiO₂ NPs podem estar associados com alteração na expressão de citocinas relacionadas à inflamação, como IL-6, IL-1 β e TNF- α .

Wu e colaboradores (2009) demonstraram que após a exposição dérmica em ratos sem pelo, as TiO₂ NPs, atingiram diferentes tecidos e induziram lesões em vários órgãos. Já por administração oral, TiO₂ NPs também atingiram outros órgãos, como cérebro (HU et al, 2010), rim, baço, pulmão (WANG et al, 2007) e fígado (CUI, 2011).

As TiO₂ NPs também apresentaram efeitos citotóxicos em células hepáticas (humana e de rato), de maneira tempo e dose dependentes. Além de alterações na viabilidade e morfologia celular, foi também observado aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio e diminuição dos níveis de GSH intracelulares (SHA et al, 2011).

Neste sentido, a avaliação da toxicidade de nanomateriais a base de TiO₂ é de suma importância, para uma melhor segurança no seu uso em alimentos, cosméticos e potenciais tratamentos de doenças.

1.2 Genotoxicidade das nanopartículas de dióxido de titânio

Em 2010, a IARC (Agência Internancional de Pesquisa em Câncer), agência ligada à Organização Mundial da Saúde, classificou o TiO₂ como possível carcinógeno para humanos (grupo 2B), (IARC, 2010)

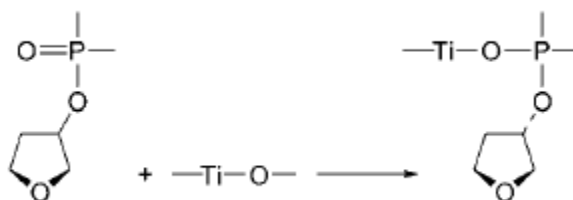
Estudos relacionados à diferentes danos ao DNA, como quebra da cadeia de DNA, são de grande importância para a avaliação de possíveis carcinógenos. A análise do dano ao DNA, induzido por TiO₂ NPs, não é recente. Em 1998, usando ensaio de eletroforese em gel de agarose/plasmídeo, Zhang e colaboradores detectaram quebras da cadeia de DNA em células do pulmão de animais tratados com as NPs.

As TiO_2 NPs também podem induzir dano oxidativo ao DNA, peroxidação lipídica e formação de micronúcleos em células humanas do epitélio brônquico (GURR et al, 2005).

Em ensaio *in vitro*, Li e colaboradores (2008) adicionaram TiO_2 NPs à DNA polimerase a fim de observar o impacto das NPs na síntese de DNA. A interação entre as TiO_2 NPs e a DNA polimerase foi analisada e observou-se que as TiO_2 NPs inibem a síntese de DNA.

Zhu e colaboradores (2007), em ensaio *in vitro*, propuseram o mecanismo pelo qual as TiO_2 NPs interagem com o DNA e induzem a sua quebra. Os resultados mostraram que ocorre ligação das TiO_2 NPs com o DNA, e o mecanismo de ligação está relacionado aos grupos fosfatos presentes na molécula. Resultados de espectroscopia de infravermelho mostraram que o local de ligação do titânio foi $\text{P}=\text{O}$, formando $\text{P}-\text{O}-\text{Ti}$, levando ao afrouxamento da ligação $\text{C}-\text{O}-\text{P}$ (Figura 2). As bases do DNA não participaram da reação.

Figura 2- Ligação do titânio à molécula de DNA através do grupo fosfato.



Fonte: Zhu et al, 2007.

1.3 Estresse oxidativo e defesa antioxidante

O oxigênio é uma molécula altamente reativa e pode ser parcialmente reduzido, resultando na formação de vários agentes químicos reativos. Através do processo de transferência de elétrons, ou a absorção de energia, ocorre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), a partir do oxigênio, dentre as quais incluem, o radical superóxido (O_2^-), o radical hidroxil (OH), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), entre outros (MANKE; WANG; ROJANASAKUL, 2013).

Diversos componentes celulares como lipídeos, proteínas e DNA são alvo potenciais do dano oxidante mediado por EROs, dentre os quais destacam-se a modificação de aminoácidos, alteração de atividades enzimáticas, modificações de

glicoproteínas, oxidação de grupos tióis em pontes dissulfeto e alterações em receptores e material genético (KLAUNIG; KLAMENDULIS, 2004).

A geração de EROs está implicada na etiologia de um grande número de doenças, alterações neurodegenerativas, lesões teciduais e toxicidade decorrente de diversos xenobióticos, incluindo nanopartículas metálicas (BRAY, 2000; MARANO et al., 2011; SANNADI; KADEYALA; GOTTIPOLU, 2013). Entretanto, a presença de EROs também é fundamental para vários processos fisiológicos normais, incluindo a defesa contra infecção, nos quais os neutrófilos são estimulados a produzir espécies reativas com a finalidade de combater microorganismos (THANNICKAL; FANBUR, 2000).

As células possuem sistemas de defesa enzimáticos e não-enzimáticos para proteger seus constituintes e manter seu estado redox (STHIJNS et al, 2016). Sob condições fisiológicas normais os efeitos nocivos das EROs são neutralizados pelo sistema de defesa antioxidante, que consiste de enzimas e de pequenas moléculas antioxidantes (LU, 2013), destacando-se as enzimas superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione S-transferase (GST) e a molécula antioxidante glutathione (GSH) (BRAY, 2000; CURTIN; DONOVAN; COTTER, 2002).

Dentre estas, a catalase é uma enzima que catalisa a decomposição do peróxido de hidrogênio em oxigênio molecular e possui atividade específica elevada (HE et al, 2014). A caracterização biológica e bioquímica dessa enzima mostra que, embora tenha sequência similar em diferentes organismos, conserva uma ampla eficiência catalítica (CHELIKANI; FITA; LOEWEN, 2004).

A glutathione peroxidase (GPx) é uma selenoproteína que reduz o peróxido de hidrogênio através da glutathione reduzida (GSH) (BRIGELIUS-FLOHÉ, 1999). A biossíntese de selenoproteínas depende da biodisponibilidade de selênio. Dessa forma, algumas selenoproteínas respondem rapidamente à deficiência de elemento (BRIGELIUS-FLOHÉ, 1999).

1.4 Selênio

O selênio é um micronutriente essencial que exerce papel antioxidante, principalmente na forma de selenoproteínas (grupo de proteínas que incorporam o selênio na forma do aminoácido selenocisteína) (TURANOV et al, 2011).

A maior parte do selênio circulante no organismo está sob a forma de selenoproteína P (DEAGEN et al, 1993; READ et al, 1990), enquanto o restante apresenta-se incorporado como selenocisteína (na GPx) ou selenometionina, ligado à albumina (DEAGEN et al, 1993).

A maioria das selenoproteínas caracterizadas funcionalmente possui função redox, conferindo atividades catalíticas ou antioxidantes (PAPP et al, 2007), e a suplementação com selênio aumenta a atividade das selenoproteínas, possivelmente pela maior incorporação de selenocisteína (SAITO; TAKAHASHI, 2002; BERGGREN et al, 1999).

Entre os processos celulares que necessitam de selenoproteínas, pode-se citar a biossíntese de desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTPs) para o DNA, redução do peróxido de hidrogênio, regulação da sinalização redox, o transporte e armazenamento de selênio e metabolismo do hormônio da tireóide (PAPP et al, 2007).

Contempre e colaboradores (1995) demonstraram que a deficiência de selênio juntamente com a deficiência de iodo aumentou a necrose, induziu a fibrose e impediu a proliferação celular epitelial da glândula tireóide, pois a geração de peróxido de hidrogênio está elevada na glândula deficiente em iodo e selênio.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) e Organização para Alimentação e Agricultura das Nações Unidas (FAO), na maioria dos países as dietas usuais satisfazem as necessidades de selênio. No entanto, a deficiência ocorre quando o solo, e conseqüentemente os alimentos ali cultivados, são pobres nesse elemento químico (WHO, FAO, 2006). Recentemente, Alehagen e colaboradores (2016) realizaram um estudo com idosos de uma área rural da Suécia e observaram que a concentração média de selênio no soro dos idosos era baixa e que ocorria maior incidência de mortalidade cardiovascular no subgrupo em que a concentração média de selênio era inferior a 65 µg/L. O mesmo estudo também mostrou que uma suplementação com selênio foi cardioprotetora em pessoas com baixa concentração do elemento.

O selênio pode prevenir alterações induzidas pela aflatoxina B1. Aflatoxinas são micotoxinas produzidas por fungos do gênero *Aspergillus*, e são encontrados principalmente em cereais. Sua ação induz lesão hepática e diminuição das enzimas catalase e GPx. A suplementação com selênio restaura a ação dessas enzimas e

aumenta a expressão de seis genes de selenoproteínas, entre elas, a GPx (SUN et al, 2016).

Em exposição ao cádmio, a suplementação com selênio diminui o dano renal oxidativo induzido por esse metal (ABARIKWU et al, 2016).

Poucos estudos correlacionam a atuação do selênio como agente antioxidante na toxicidade induzida por NPs. Ansar e colaboradores (2017) demonstraram que as nanopartículas de prata são capazes de diminuir a ação da catalase e GPx no fígado de animais tratados com essas NPs, e que o tratamento com selênio restaura a atividade dessas enzimas. Esse estudo sugere que o selênio evita a formação de radicais livres, aumentando a atividade antioxidante do tecido.

Sendo assim, é de grande importância o estudo da ação antioxidante do selênio sobre a toxicidade induzida pelas TiO₂ NPs.

2. HIPÓTESE

De acordo com o exposto acima, as nanopartículas de dióxido de titânio são capazes de produzir EROs intracelular, as quais são capazes de desestabilizar o sistema antioxidante e causar danos ao DNA. O selênio é um importante antioxidante e poderá conferir efeito protetor sobre a toxicidade induzida pelas TiO₂ NPs em ratos *Wistar*.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O presente trabalho tem como objetivo geral avaliar os efeitos da exposição sub-crônica às nanopartículas de TiO_2 associados a biodistribuição de titânio em tecidos de ratos *Wistar* e possível efeito protetor do selênio sobre esses efeitos.

3.2 Objetivos Específicos

- Investigar a atividade das enzimas catalase e GPx no sangue de ratos *Wistar*, após exposição subcrônica às TiO_2 NPs;
- Avaliar o potencial genotóxico de TiO_2 NPs por meio do ensaio de cometa;
- Avaliar a concentração de titânio e selênio no fígado, rim, pulmão, cérebro e sangue de ratos *Wistar* após exposição subcrônica às TiO_2 NPs e/ou selênio;
- Avaliar o efeito protetor do selênio sobre enzimas antioxidantes após exposição subcrônica às TiO_2 NPs;
- Avaliar o possível efeito protetor do selênio sobre efeitos genotóxicos da exposição às TiO_2 NPs.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Equipamentos e acessórios

Para a caracterização das TiO₂ NPs, utilizou-se um analisador de tamanho de partícula Zetasizer Nano ZS90 DLA (Malvern Instruments Ltd, Inglaterra) e um microscópio eletrônico de transmissão JEM-100CXII (JEOL, Japão). Na quantificação da concentração de titânio e selênio total utilizou-se um espectrômetro de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) Agilent 7700 (Hachioji, TY, Japão). Os biomarcadores do estresse oxidativo (GPx e CAT) foram quantificados em espectrofotômetro UV/VIS PerkinElmer (Shelton, CT, USA). As lâminas do Ensaio Cometa foram analisadas em microscópio de fluorescência Carl Zeiss-AxioStar Plus, Jena, Thuringia (Alemanha).

4.2 Reagentes e soluções

Dióxido de titânio (Sigma-Aldrich - St. Louis, MO, USA), selenato de sódio (Sigma-Aldrich - St. Louis, MO, USA), citrato de sódio, pentobarbital sódico, água deionizada de alta pureza (resistividade 18,2 M Ω.cm) obtida pelo sistema Milli-Q (Millipore[®]), fosfato de potássio mono e dibásico, peróxido de hidrogênio (H₂O₂), ácido etilenodiamino tetracético (EDTA), glutathiona reduzida (GSH), glutathiona redutase (GSHR), Triton[®] X-100, azida sódica, nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato reduzido (NADPH), azul de Tripán, agarose LMP (low melting point), agarose NMP (normal melting point), dimetilsulfóxido (DMSO), cloreto de sódio (NaCl), Tris, EDTA, hidróxido de sódio (NaOH), etanol absoluto, gel REDTM, hidróxido de tetrametilamônio (TMAH) (Sigma-Aldrich - St. Louis, MO, USA), ácido nítrico (HNO₃).

Todas as soluções e amostras foram armazenadas em frascos de polietileno, após prévio tratamento para eliminação de contaminantes. Frascos de plástico e materiais de vidro foram mergulhados em solução contendo 10% v/v HNO₃ por 24 h, lavados com água Milli-Q e secos em capela de fluxo laminar classe 100. Todas as operações para preparo das soluções foram realizadas em sala limpa.

4.3 Caracterização das nanopartículas de dióxido de titânio

A caracterização das TiO₂ NPs foi realizada em um estudo prévio, realizado por Martins et al, 2017.

Para se obter informação sobre o raio hidrodinâmico médio e a distribuição de tamanho das partículas, foram realizadas medições dinâmicas de dispersão de luz com um equipamento Zetasizer Nano ZS90 DLA (Malvern Instruments Ltd, Inglaterra). Utilizou-se uma cubeta QS 3 mm como recipiente de amostra. As fases cristalinas das nanopartículas foram determinadas por difratômetro de raios-X (XRD 6000, Shimadzu) e os dados foram coletados de 20 a 80° 2 θ a uma amplitude de 0.5°, 10s por fase, a 40 kV, 200 mA e radiação CuK α ($\lambda = 1,540560 \text{ \AA}$). Foi utilizado silicone como padrão externo.

O tamanho das NPs foi caracterizado por microscopia eletrônica de transmissão (TEM), usando um microscópio eletrônico de transmissão JEM-100CXII (JEOL, Japão) com uma tensão de aceleração variando de 100 a 200 kV.

4.4 Nanopartículas de dióxido de titânio

As nanopartículas de dióxido de titânio utilizadas foram obtidas da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). A solução das nanopartículas foi preparada em meio de citrato de sódio (0,1 mol.L⁻¹; pH 4,5), o qual também foi utilizado como veículo no grupo controle. As nanopartículas de titânio (1,5 mg.kg⁻¹) foram administradas por gavagem gástrica diariamente, no volume de 1 mL, durante o período de sessenta dias, uma vez ao dia.

4.5 Selênio

Para o tratamento dos animais, selenato de sódio foi obtido da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), no qual uma solução aquosa contendo 6 mg.L⁻¹ foi oferecida *ad libitum*, na água de beber. Esta concentração foi selecionada baseado em estudos anteriores do grupo (Grotto et al, 2009).

Foi realizada troca da solução de selênio na garrafa dos animais a cada dois dias. O tratamento com selênio foi uma suplementação desse micronutriente, uma vez que ele já é fornecido na ração dos animais (Tabela 1).

Tabela 1 - Microelementos presentes na ração fornecida aos animais

Microelemento	Concentração
Ferro	50 mg.kg ⁻¹
Manganês	60 mg.kg ⁻¹
Zinco	10 mg.kg ⁻¹
Cobre	10 mg.kg ⁻¹
Iodo	2 mg.kg ⁻¹
Selênio	0,05 mg.kg ⁻¹
Cobalto	1,5 mg.kg ⁻¹

Fonte: Nuvilab CR-1 Autoclavável – Ração para animais de laboratório

4.6 Animais

Para o desenvolvimento deste trabalho, foram utilizados ratos *Wistar*, machos (200-250g). Os animais foram mantidos em sala com temperatura controlada (22-25°C) com ciclo claro/escuro de 12 h e alimentados com ração e água *ad libitum*. O experimento foi conduzido segundo as normas da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP (Número de aprovação do processo: 15.1.964.60.0). A aprovação pela Comissão de Ética no uso de animais encontra-se em anexo (Anexo A).

4.7 Delineamento Experimental

4.7.1 Escolha da dose das nanopartículas de dióxido de titânio e selênio

Normalmente os estudos experimentais com animais utilizam doses de TiO₂ NPs muito elevadas, variando de 5 a 1000 mg.kg⁻¹ (JIA et al, 2017; SYCHEVA et al, 2011), o que é muito superior às doses da exposição humana (0,2 – 2 mg.kg⁻¹) (WEIR et al, 2012). Dessa forma, optamos por utilizar uma dose de 1,5 mg.kg⁻¹, que se aproxima mais da dose real de exposição.

Em relação ao selênio, nosso grupo demonstrou que a concentração de 6 mg.L⁻¹ de selênio na água dos animais reduziu os danos no DNA promovido pela exposição ao metilmercúrio (GROTTO et al, 2009). Dessa forma, essa foi a dose de escolha para o tratamento dos animais com selênio.

4.7.2 Tratamento dos animais

Antes do início do tratamento, os animais foram acondicionados em caixas de polipropileno (dois animais por caixa) e aclimatados por um período de uma semana.

Os animais foram distribuídos nos seguintes grupos experimentais (6 animais/grupo):

Grupo I: controle, tratados com Citrato de Sódio ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$);

Grupo II: tratados com TiO_2 NPs estabilizadas com Citrato de Sódio ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$) na dose de $1,5 \text{ mg.kg}^{-1}$;

Grupo III: tratados com TiO_2 NPs estabilizadas com Citrato de Sódio ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$) na dose de $1,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ + Selênio (6 mg.L^{-1});

Grupo IV: tratados com Selênio (6 mg.L^{-1}).

A massa corporal dos animais foi mensurada semanalmente com a finalidade de acompanhar o crescimento dos animais e adequar a dose de TiO_2 NPs.

4.8 Eutanásia dos animais, retirada e armazenamento dos órgãos

Após tratamento de sessenta dias os animais foram eutanasiados com sobredose de pentobarbital sódico (100 mg.Kg^{-1}) intraperitoneal. Os animais foram posicionados em uma mesa cirúrgica em decúbito dorsal para efetuar a retirada dos órgãos (fígado, rim, pulmão e cérebro) e sangue. Os tecidos foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ até o momento da análise.

4.9 Determinação de titânio e selênio em tecidos e sangue por ICP-MS

A determinação das concentrações de titânio e selênio nos fluidos biológicos e tecidos dos animais foram realizadas em um espectrômetro de massas com plasma acoplado indutivamente. Este equipamento encontra-se instalado no Laboratório de Inorgânicos da Fundação Jorge Duprat Figueiredo de Segurança e Medicina do Trabalho (FUNDACENTRO) em São Paulo, sob a coordenação do Prof. Dr. Walter dos Reis Pedreira Filho.

Para análise de sangue, o método utilizado foi o de Batista e colaboradores. (2009a). Curvas de calibração com ajuste de matriz foram confeccionadas em $0,5 \text{ } \%$ v/v HNO_3 + $0,01 \%$ v/v de Triton X-100 contendo sangue base ($1:50$ v/v diluição final) e os analitos nas concentrações de $0 - 20 \mu\text{g.L}^{-1}$. Como padrão interno foi utilizado

ítrio (Y) na concentração de $10 \mu\text{g.L}^{-1}$. Os coeficientes de correlação das curvas foram sempre maiores ou iguais a 0,999.

Para as curvas de calibração preparadas pelo método de ajuste de matriz, foi utilizado sangue não exposto (sangue base).

Para avaliação da exatidão e da precisão das análises de sangue foi utilizado o material de referência de sangue SeronormTM Trace Elements Whole Blood Lyophilized (Norway).

Para análise nos órgãos dos ratos, o método utilizado foi o de Batista e colaboradores (2009b). Assim, 50–100 mg de cada órgão foi pesado e transferido para um tubo cônico e 1 mL de TMAH 50% (v/v) foi adicionado às amostras. Após incubação, durante 24h à temperatura ambiente, foram adicionados 9mL de diluente contendo 0,5% de HNO_3 (v/v) e 0,01% de Triton® X-100. Curvas de calibração contendo TMAH 50% (v/v) foram confeccionadas em 0,5 % v/v HNO_3 + 0,01% v/v de Triton X-100 e os analitos nas concentrações de 0 – $20 \mu\text{g.L}^{-1}$. Como padrão interno foi utilizado Y na concentração de $10 \mu\text{g.L}^{-1}$. Os coeficientes de correlação das curvas foram sempre maiores ou iguais a 0,999.

Para avaliação da exatidão e da precisão das análises dos órgãos foram utilizados os materiais de referência SRM 1577a - *Bovine Liver* proveniente do *National Institute of Standards and Technologies* (NIST) e *Lobster Hepatopancreas* - TORT-2 proveniente do *National Research Council Canada*.

As condições instrumentais de operação do ICP-MS estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2 - Condições experimentais do ICP-MS

Parâmetro	Condição / Característica
Potência de Radiofrequência	1550W
Vazão do gás (Ar)	Plasma 15 L.min ⁻¹ ; Auxiliar 0,9 L.min ⁻¹
Vazão do gás de colisão (He)	5 e 10 para <i>high energy mode</i>
Nebulizador	Micro-mist, vazão 1,1 L.min ⁻¹
Câmara	Quartzo, <i>double pass</i>
Rotação da bomba peristáltica	10 rpm
Interface	Cones de platina
Cone de amostragem	1,1 mm
<i>Skimmer</i>	0,9 mm
Replicatas	3
<i>Sweeps</i>	40
Leituras	1
Padrão Interno	⁸⁹ Y
Isótopo	⁸² Se, ⁴⁷ Ti

4.10 Avaliação do dano ao DNA pelo Ensaio Cometa

A avaliação do dano ao DNA pelo ensaio cometa foi realizado no Laboratório de Nutrigenômica, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP, sob supervisão da Prof^a Dr^a Lusânia Maria Gregg Antunes.

O princípio básico do Ensaio Cometa (ou “Single Cell Gel Electrophoresis”) é a migração do DNA em uma matriz de agarose sob condições eletroforéticas. Quando observadas em microscópio, os nucleóides têm a aparência de um cometa, com cabeça (a região nuclear) e uma cauda contendo os fragmentos de DNA que migraram em direção ao pólo positivo (HARTMANN et al., 2003). O teste é muito utilizado na identificação de agentes com atividades genotóxicas (FARBAIRN et al., 1995). A versão alcalina (pH>13 do tampão de eletroforese) pode ser usada para detectar danos ao DNA do tipo quebras de fita simples, sítios alcali lábeis, pontes entre DNA-DNA e DNA-proteína. As análises foram realizadas pelo método de Singh et al., 1988, modificado por Tice et al., 2000. Foram avaliadas amostras de fígado e cérebro dos animais coletados após sessenta dias de tratamento. Foram preparadas suspensões celulares obtidas por separação mecânica, onde 300 mg de tecido foram processados em 1800 µL de solução de Hanks (HBSS - Hanks' Balanced Salt Solution) + 200 µL de DMSO. Alíquotas das suspensões celulares foram utilizadas

para a determinação da viabilidade celular pelo método de exclusão do azul de tripan, e as lâminas só foram confeccionadas quando a viabilidade foi superior a 70% em relação aos animais do grupo controle. No preparo das lâminas, alíquota de 80 μL de suspensão celular foi misturada com 240 μL de agarose de baixo ponto de fusão aplicada em lâmina pré-coberta com agarose normal e incubadas 4°C por 20 minutos. As lâminas foram, em seguida, imersas em solução de lise (NaCl, Tris, EDTA, DMSO, Triton X-100, pH 10) *overnight*. As lâminas foram, então, incubadas por 20 minutos em solução de eletroforese (NaOH e EDTA, pH >13), seguido de eletroforese a 25V e 300 mA por 20 minutos. Após a eletroforese, as lâminas foram neutralizadas (0,4 M Tris, pH 7,5) por 5 minutos e fixadas em etanol absoluto por 2 minutos. Imediatamente antes da análise, as lâminas foram coradas com o agente intercalante de DNA GelREDTM [1:10.000 (v/v)] por 4 minutos, e examinadas em microscópio de fluorescência (Carl Zeiss-AxioStar Plus, Jena, Thuringia, Alemanha), acoplado a uma câmera usando filtro 515-560 nm e barreira de filtro de 590 nm, em objetiva de 20x. Para cada animal foram analisados 100 nucleóides. As imagens dos nucleóides foram avaliadas com o auxílio do software CometAssay IV (Perceptive Instruments©, Bury St Edmunds, Suffolk, Inglaterra), sendo analisado o parâmetro *Tail intensity*, referente à porcentagem de DNA na cauda.

4.11 Atividade da enzima catalase

A atividade da enzima catalase foi avaliada por espectrofotometria de UV/VIS PerkinElmer (Shelton, CT, USA) utilizando método de Aebi (1984). Para a determinação da atividade da catalase ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ metabolizado. $\text{min}^{-1}.\text{mg proteína}^{-1}$) uma alíquota de 20 μL de sangue foi diluída com 1,910 mL do tampão fosfato de potássio (pH 7,0). Foram adicionados 70 μL de H_2O_2 , dando início à reação. Foi mensurado o decaimento da concentração de H_2O_2 a $\lambda = 240$ nm, durante 5 minutos. Os valores da atividade da catalase no sangue estão expressos por uma constante de variação (k) relacionada com a hemoglobina (Hb).

4.12 Atividade da enzima glutathiona peroxidase

A atividade da glutathiona peroxidase (GPx) foi determinada conforme descrito por Paglia; Valentine (1967). Uma alíquota de 20 μL de sangue foi adicionada a 800 μL de sistema (0,15 mmol.L^{-1} NADPH, 1 mmol.L^{-1} GSH, 0,1 U/mL GR e 100 mmol.L^{-1}

azida em tampão de fosfato de potássio), 20 μL de água deionizada e 100 μL de peróxido de hidrogênio ($0,4 \text{ mmol.L}^{-1}$). A mudança da absorbância, por minuto, foi lida em espectrofotômetro PerkinElmer (Shelton, CT, USA) a 340 nm e a atividade da GPx está expressa em $\mu\text{mol NADPH/min/mg Hb}$.

4.13 Determinação da Hemoglobina

A hemoglobina foi quantificada pelo kit da Doles Reagentes e Equipamentos para Laboratórios Ltda (Goiânia, GO, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante. A metodologia do kit se baseia na oxidação da hemoglobina por Ferricianeto de Potássio, dando origem a hemiglobina. Quando combinada com Cianeto de Potássio, a hemiglobina leva à formação do composto estável Cianeto de Hemiglobina. Esse composto emite uma cor que é de intensidade proporcional ao teor de hemoglobina no sangue.

4.14 Análises Estatísticas

Os dados foram analisados usando GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). As comparações foram realizadas utilizando-se one-way ANOVA, com o teste de Tukey. Foram considerados significantes valores de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização das nanopartículas de dióxido de titânio

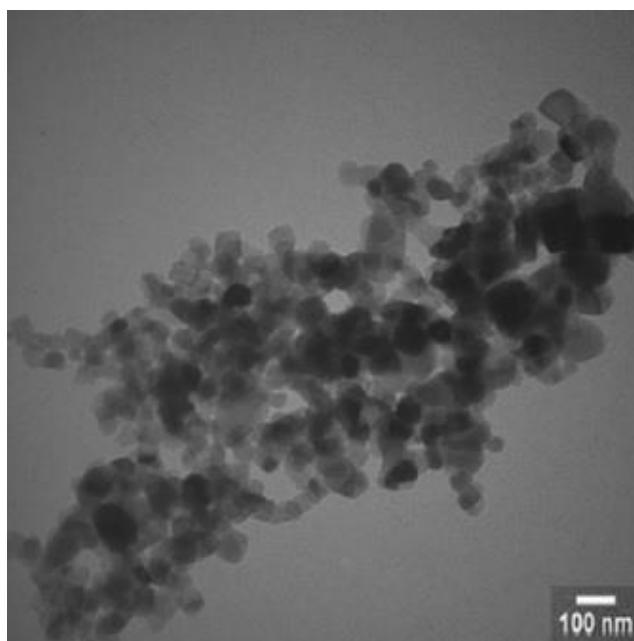
As nanopartículas utilizadas neste estudo foram caracterizadas a fim de se conhecer o tamanho e o diâmetro hidrodinâmico deste material. Os resultados encontram-se na tabela 3. A microscopia eletrônica de transmissão mostra que as nanopartículas não estavam aglomeradas, e, portanto, eram estáveis e estavam dispersas na solução (Figura 3).

Tabela 3 - Caracterização das nanopartículas de dióxido de titânio

Tamanho da nanopartícula	Diâmetro hidrodinâmico
41,99 ± 1,6 nm	447,7 ± 6,43 nm

Fonte: Martins et al, 2017

Figura 3 - Microscopia eletrônica de transmissão (TEM) das nanopartículas de dióxido de titânio.

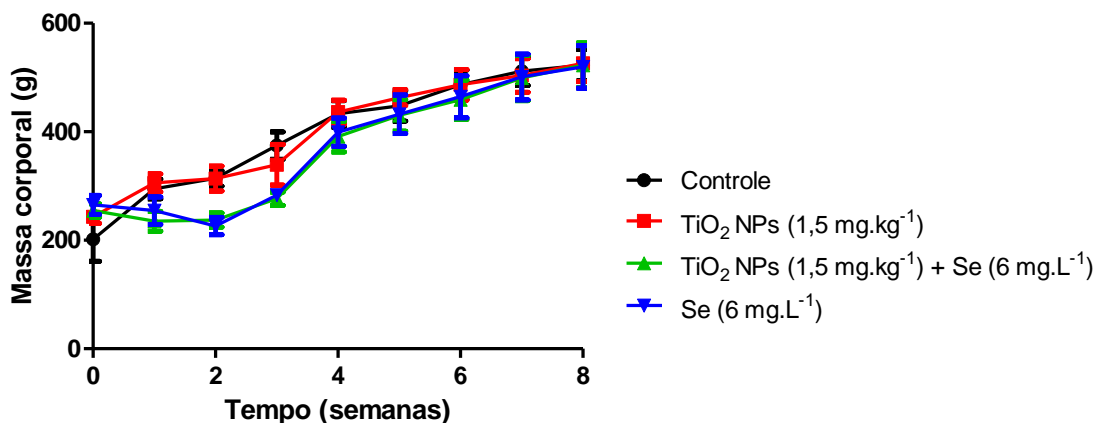


Fonte: Martins et al, 2017.

5.2 Massa corporal dos animais

Com o intuito de ajustar a dose das TiO₂ NPs administradas semanalmente e acompanhar o crescimento dos animais, a massa corporal dos animais foi verificada (Figura 4).

Figura 4 - Variação da massa corporal dos animais tratados ou não com dióxido de titânio e/ou selênio.



Os resultados estão representados pela média \pm desvio-padrão. (n=6). Fonte: elaborado pela autora.

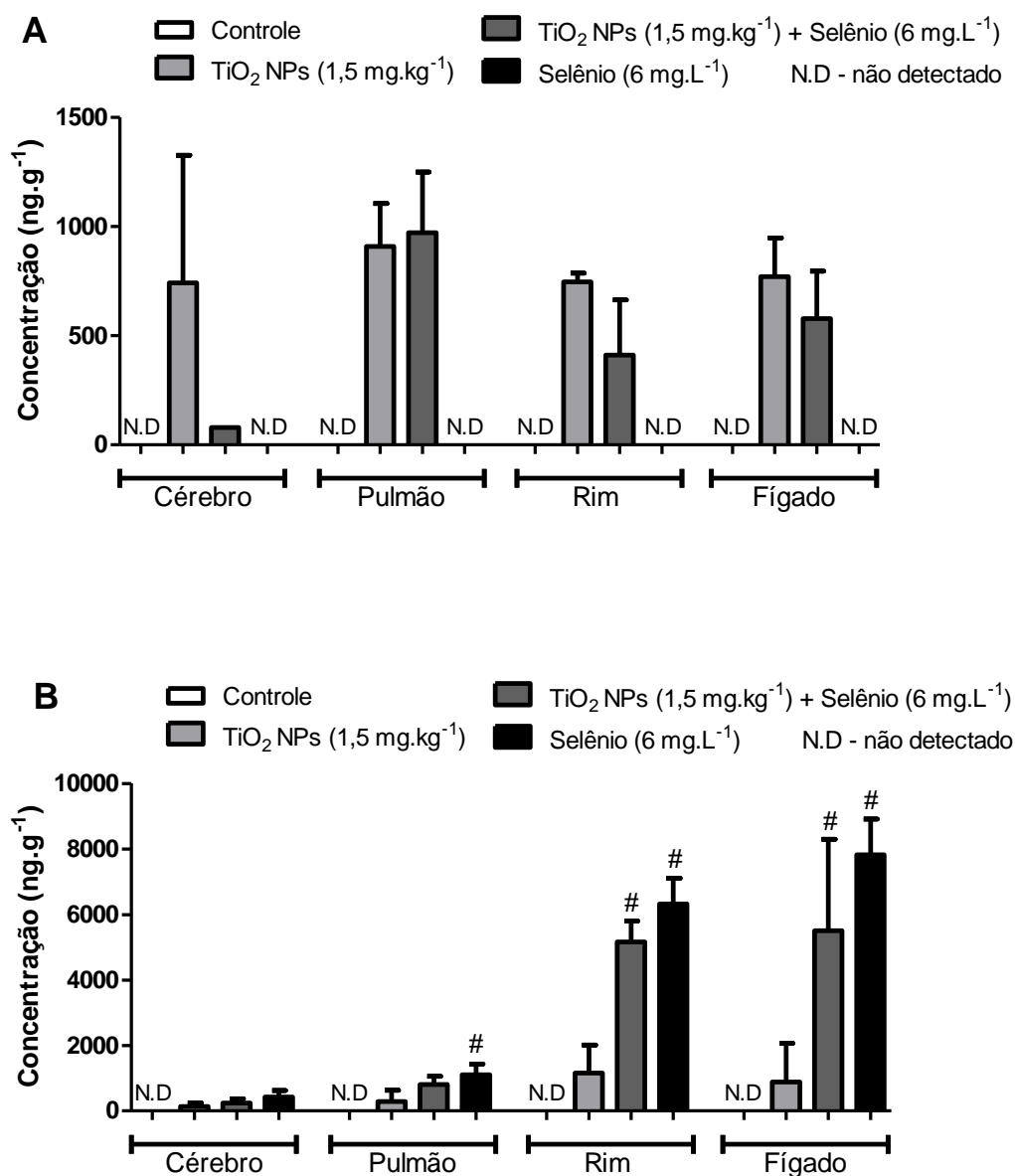
De acordo com a figura 4, não houve diferença estatística na massa corporal entre os animais tratados e o grupo controle, demonstrando que qualquer um dos tratamentos não influenciou no ganho de massa dos animais.

5.3 Determinação de titânio e selênio em amostras de tecidos dos animais

Os resultados obtidos na determinação de titânio e selênio são mostrados na figura 5.

De acordo com os resultados, foi detectado titânio nos órgãos analisados dos animais dos grupos TiO₂ NPs e TiO₂ NPs + selênio (Figura 5A). Porém, não houve diferença estatística entre esses grupos, demonstrando que o selênio não influenciou na deposição do titânio nos órgãos. Ademais, não foi detectado titânio no grupo controle e no grupo tratado apenas com selênio.

Figura 5 - Análise da concentração de Titânio (A) e Selênio (B) em amostras do cérebro, pulmão, rim e fígado de animais tratados ou não com nanopartículas de dióxido de titânio e/ou selênio.



Os resultados estão representados pela média \pm desvio-padrão. [#] $p < 0,05$ versus grupo tratado com TiO₂ NPs, no órgão correspondente. Fonte: elaborado pela autora.

O selênio é um micronutriente essencial ao organismo, e está presente na alimentação dos animais. Dessa forma, foi detectado esse elemento nos diferentes órgãos, dos diferentes tratamentos (Figura 5B). Nossos resultados mostraram que a maior deposição de selênio ocorreu nos rins e fígado do grupo TiO₂ NPs + selênio e grupo selênio. Essa deposição, foi significativamente maior em relação ao grupo

tratado apenas com TiO₂ NPs. No pulmão, a deposição desse elemento foi maior no grupo selênio, em relação ao grupo tratado apenas com TiO₂ NPs, e não houve diferença em relação ao grupo TiO₂ NPs + selênio. Na análise do cérebro, não houve diferença na deposição de selênio entre os grupos estudados.

As TiO₂ NPs podem atravessar a membrana celular por endocitose, e adentrar no citoplasma, conferindo danos celulares (MANO et al, 2012). Shukla e colaboradores (2013) mostraram que as TiO₂ NPs podem adentrar à célula e se depositar no citoplasma e núcleo. A entrada das nanopartículas na célula depende do tamanho e das propriedades de superfície das mesmas (HONG; ZHANG, 2016).

A deposição das TiO₂ NPs é dose-dependente e pode ser encontrada em diferentes tecidos (TASSINARI et al, 2014; MEENA; PAULRAJ, 2012). Além disso, Jia e colaboradores (2017) sugerem que as TiO₂ NPs podem ser absorvidas pelo trato gastrointestinal, serem distribuídas pelo sistema circulatório e então depositadas no fígado, rins, baço, pulmão, cérebro e coração dos animais. Martins e colaboradores (2017) mostraram que, na dose de 0,5 mg.kg⁻¹, as TiO₂ NPs acumulam-se no fígado e rins de ratos expostos.

As TiO₂ NPs, como mostrado nesse trabalho, acumularam-se no fígado e rins dos animais tratados. Este acúmulo leva à alterações histopatológicas e apoptose dos hepatócitos, decorrente do inchaço mitocondrial e aparecimento de vacúolos nucleares, comprometendo a função hepática (MA et al, 2009). Além disso, pode ocorrer alterações nos níveis de proteína total, glicose e fosfatase alcalina no fígado, e aumento significativo de nitrogênio uréico e ácido úrico no sangue, o que pode levar à toxicidade hepática e renal (VASANTHARAJA et al, 2014).

Em um estudo conduzido por Fabian e colaboradores (2008), a administração intra-venosa de 5 mg.kg⁻¹ de TiO₂ NPs, em uma única dose, mostrou que as nanopartículas permanecem no fígado por mais tempo (28 dias) do que em outros órgãos, como baço, pulmão e rins. Além disso, estes mesmos autores demonstraram que não houve alterações nas citocinas e enzimas presentes no sangue.

Utilizando doses de 324 a 2592 mg.kg⁻¹, Chen e colaboradores (2009) mostraram que a administração intra-venosa, em uma única dose, de TiO₂ NPs pode originar comportamento passivo, letargia, tremor e perda de apetite em camundongos. Além disso, as NPs acumularam-se no fígado, rins, pulmões e baço, causando necrose hepatocelular, apoptose e fibrose hepática, e inchaço do

glomérulo renal. No sistema pulmonar, foi encontrado trombose, sugerindo que as NPs poderiam induzir o bloqueio dos vasos sanguíneos nesse sistema.

Em exposição crônica via nasal, em doses de 1,25 a 5 mg.kg⁻¹, o titânio acumula nos pulmões, induzindo inflamação pulmonar e fibrose em camundongos (HONG et al, 2017a), além de promover a infiltração de células inflamatórias e tumorigênese no pulmão (HONG et al, 2017b).

No cérebro, em doses acima de 150 mg.kg⁻¹, ocorre invasão de células inflamatórias e rompimento das células nervosas, sugerindo que as TiO₂ NPs podem causar dano morfológico no tecido cerebral (JIA et al, 2017). Em tratamento subcrônico, doses elevadas (100 e 200 mg.kg⁻¹) de TiO₂ NPs podem levar à diminuição da atividade da acetilcolinesterase e aumento da IL-6 (citocina pró-inflamatória) no tecido cerebral, sugerindo que a ingestão oral de TiO₂ NPs pode induzir neuroinflamação e ser neurotóxica (GRISSA et al, 2016).

Embora os resultados do presente estudo não demonstrem os danos causados pelas TiO₂ NPs em nível celular, este corrobora com o encontrado por diversos autores, demonstrando que as TiO₂ NPs acumularam-se em diferentes órgãos dos animais estudados. O selênio, embora detectado em todos os tratamentos, não influenciou na deposição do titânio.

Na avaliação do sangue, verificamos que as concentrações de titânio ficaram abaixo do limite de detecção em todos os grupos estudados (dados não mostrados). Krevling e colaboradores (2017) administraram as TiO₂ NPs nos animais em uma única dose, por gavagem, e mostraram que os mecanismos de depuração do sangue foram estabilizados rapidamente, com retenção decrescente das NPs até 7 dias após a administração. Em relação à administração intra-venosa, ficou demonstrado que as TiO₂ NPs se distribuem rapidamente para vários tecidos (SHINOHARA et al, 2014; GERAETS et al, 2014).

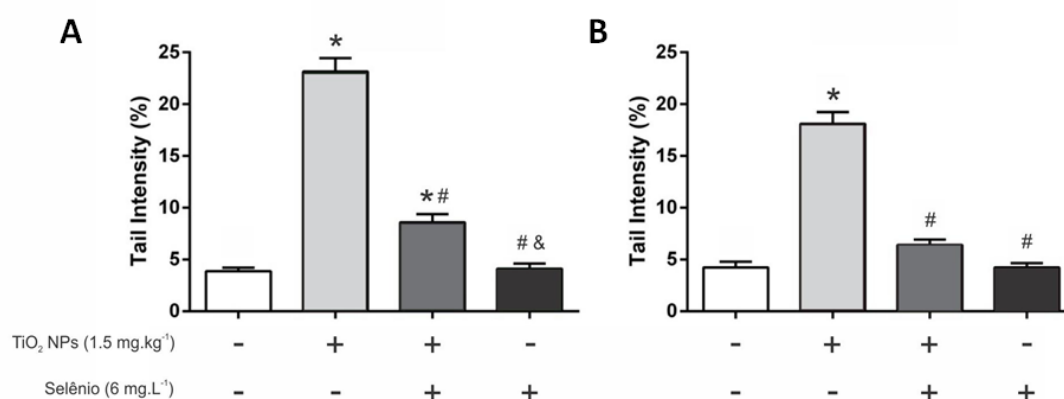
Resultados do presente estudo e de outros encontrados na literatura mostram que independentemente da via de exposição e da concentração das NPs, as mesmas se distribuem e se depositam em diversos órgãos.

5.4 Avaliação da genotoxicidade das nanopartículas de dióxido de titânio em amostras de fígado e cérebro dos animais

Uma vez verificada a deposição das TiO₂ NPs e do selênio nos órgãos dos animais, foi realizada a avaliação da genotoxicidade das NPs e se o selênio foi capaz de proteger contra essa genotoxicidade.

A determinação dos possíveis danos ao DNA causados pelo tratamento com TiO₂ NPs foi realizada pelo ensaio cometa. Para isso, foi utilizado o parâmetro *Tail Intensity*, que equivale à porcentagem de DNA na cauda dos nucleóides (% DNA na cauda). Os resultados obtidos nas amostras de fígado e cérebro de ratos expostos aos tratamentos estão apresentados na Figura 6.

Figura 6 - Porcentagem média de DNA na cauda (*Tail Intensity*) avaliada pelo ensaio cometa em amostras de fígado (A) e cérebro (B) dos animais tratados ou não com nanopartículas de dióxido de titânio e/ou selênio.



Os resultados estão representados pela média \pm desvio-padrão. * $p < 0,05$ versus controle; # $p < 0,05$ versus grupo tratado com TiO₂ NPs.; & $p < 0,05$ versus grupo tratado com TiO₂ NPs + selênio. Fonte: elaborado pela autora.

Pode-se observar que o tratamento com TiO₂ NPs aumentou os danos ao DNA nas células do fígado (Figura 6A) e do cérebro (Figura 6B), indicando que TiO₂ NPs possuem efeitos genotóxicos nos tecidos avaliados na dose e tempo de administração estudados. Estes resultados são validados pelos baixos índices de danos no DNA dos grupos controles, onde as amostras de fígado e cérebro apresentaram valores de porcentagem de DNA na cauda (*Tail Intensity*) inferiores a 6%, como recomendado pelo *Guideline* da OECD nº 489 (OECD, 2014).

Também foi observado que o tratamento TiO₂ NPs + selênio reduziu significativamente os danos no DNA, causados pela exposição às TiO₂ NPs, em ambos os tecidos, sugerindo, assim, efeito protetor do selênio. O tratamento apenas com selênio não apresentou diferença nos danos ao DNA das células de fígado e cérebro em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

O fígado é um órgão que apresenta acúmulo de TiO₂ NPs, sendo um órgão potencial para a toxicidade de NPs (LI et al, 2017; TROUILLER et al, 2009). Dessa forma, foi avaliado o potencial genotóxico das TiO₂ NPs nesse órgão.

Resultados deste estudo mostram que mesmo em doses baixas (1,5 mg.kg⁻¹) as TiO₂ NPs aumentaram significativamente a % de DNA na cauda dos nucleóides no fígado. Aumento da % de DNA na cauda dos nucleóides também foi encontrado por Shukla e colaboradores (2014), em animais tratados com 50 e 100 mg.kg⁻¹ de TiO₂ NPs. A explicação a estes achados sugerida por aqueles autores é que o estresse oxidativo induzido pelas TiO₂ NPs promovem danos ao DNA, iniciando a expressão de proteínas apoptóticas, o que resulta em lesões hepáticas.

A forma de administração das TiO₂ NPs não parece influenciar no dano causado por essas NPs no tecido hepático. Na administração por gavagem, o tratamento com 200 mg.kg⁻¹ apresentou maior percentual de DNA na cauda nas células do fígado em relação ao controle (SYCHEVA et al, 2011), do que a administração de 2 g.kg⁻¹ de TiO₂ NPs pela mesma via. Nesse caso, ocorreu aumento de 4 vezes em relação ao grupo controle (NIU et al, 2017). Quando administradas intraperitonealmente, em doses de 50 mg.kg⁻¹, as TiO₂ NPs se depositaram no fígado aumentaram significativamente os danos ao DNA nesse órgão (LI et al, 2017).

As TiO₂ NPs são capazes de promoverem efeitos genotóxicos a um órgão distante do local de aplicação, e a genotoxicidade dessas NPs é surpreendentemente alta no fígado (RELIER et al, 2017).

O cérebro é outro órgão no qual ocorre deposição de NPs (RECORDATI et al, 2016; SONAVANE; TOMODA; MAKINO, 2008), entre as quais, as de dióxido de titânio (PUJALTÉ et al, 2017).

Os resultados deste estudo no tecido cerebral corroboram com o encontrado por Valdiglesias e colaboradores (2013), que investigaram os efeitos das TiO₂ NPs em células neuronais humanas. Foi observado que as TiO₂ NPs foram internalizadas pelas células, induzindo aumento da % de DNA na cauda dos nucleóides. Além

disso, as TiO₂ NPs induziram alterações no ciclo celular e apoptose nas células neuronais. Resultado semelhante foi encontrado por Yu; Ren; Ren (2008), no qual avaliaram *in vitro* o impacto das TiO₂ NPs nos neurônios do bulbo olfatório, demonstrando que as TiO₂ NPs promovem a fragmentação do DNA, provocam apoptose neuronal e reduzem a regulação da proteína marcadora olfativa, contribuindo para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas.

Embora observou-se dano ao DNA em consequência da exposição às TiO₂ NPs no presente estudo, a ação genotóxica dessas nanopartículas sobre o tecido cerebral ainda não está claramente estabelecida. Sycheva e colaboradores (2011) observaram que não ocorreu aumento significativo do percentual de DNA na cauda dos nucleóides das células cerebrais de animais tratado por gavage, com 40, 200 e 1000 mg.kg⁻¹, durante 7 dias.

O mesmo foi observado por Mohamed & Hussien (2016). No tratamento de animais com 500 mg.kg⁻¹, via oral, a % de DNA na cauda dos nucleóides não apresentou diferença entre os tempos de tratamento. Porém, ocorreu aumento significativo no comprimento da cauda (*tail length*) de todos os grupos em relação ao controle. Ademais, as TiO₂ NPs induziram uma mutação pontual no gene Presenilin 1 (éxon 5), o qual é ligado às formas hereditárias da doença de Alzheimer. Dessa forma, os autores sugerem que as TiO₂ NPs são genotóxicas e mutagênicas.

Embora os efeitos tóxicos das TiO₂ NPs já sejam bem estudados, os ensaios sobre a neurotoxicidade e os estudos sobre possíveis efeitos específicos no sistema neuronal ainda necessitam de maior aprofundamento.

O presente estudo demonstrou que o selênio diminuiu os danos ao DNA induzido pelas TiO₂ NPs. Foi demonstrado que o selênio, na concentração de 1 µg.mL⁻¹, apresentou efeito protetor sobre os danos no DNA quando culturas de células HepG2 (linhagem celular de fígado) foram co-expostas com chumbo e selênio (McKELVEY, HORGAN; MURPHY, 2015). O selênio também reduziu os danos ao DNA de leucócitos quando co-administrado com o herbicida Paraquat (ELLWANGER et al, 2015).

Duas classes de ftalatos (DEHP e MEHP) produziram danos significativos ao DNA em células da próstata (LNCaP). Ao se administrar selênio inorgânico (selenito de sódio) e selênio orgânico (selenometionina), ocorre redução dos efeitos genotóxicos produzidos por esses ftalatos (ERKEKOGLU et al, 2010). Resultado semelhante foi encontrado por Lynch e colaboradores (2017). Células IPEC-J2

(células do jejuno de porcos) apresentaram proteção genotóxica contra o cádmio quando incubadas com o metal e formas orgânicas de selênio. Grotto e colaboradores (2009) demonstraram que a co-administração de selênio com metilmercúrio reduziu o dano ao DNA no sangue promovido pela forma orgânica de mercúrio.

Poucos estudos analisaram os efeitos do selênio sobre a genotoxicidade e os estudos relacionando NPs e selênio são muito escassos, sendo este o primeiro estudo que avaliou o efeito protetor do selênio na genotoxicidade induzida pelas TiO₂ NPs. Dessa forma, novos estudos devem ser realizados a fim de elucidar os mecanismos pelos quais o selênio diminui os danos causados ao DNA, tanto no fígado, quanto no cérebro, em modelo de toxicidade por NPs.

5.5 Avaliação dos parâmetros redox em amostras de sangue dos animais

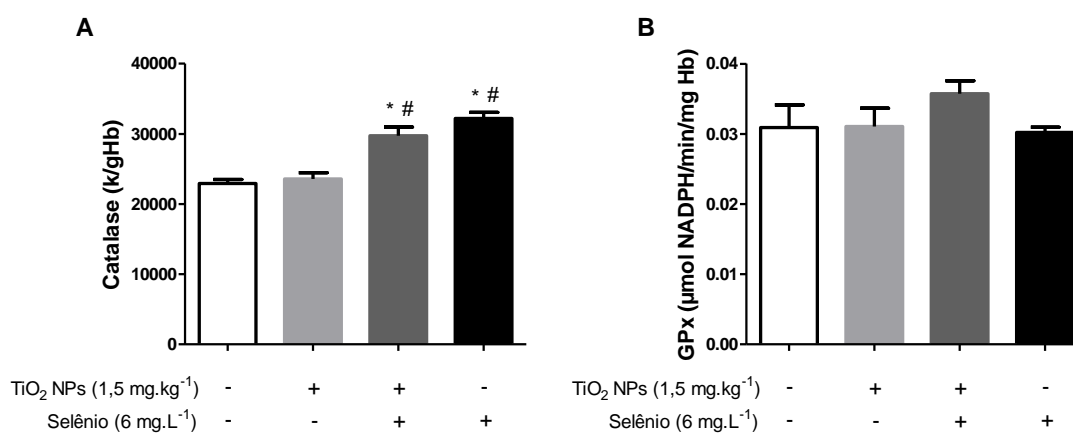
As EROs são produtos naturais derivados do metabolismo celular. Porém, há uma variedade de enzimas, como a catalase e a glutathione peroxidase (GPx), que auxiliam na eliminação desses produtos e contribuem para a homeostasia do organismo.

O peróxido de hidrogênio (H₂O₂) é um produto do metabolismo celular e deve ser rapidamente reduzido, devido ao seu alto poder oxidante. As enzimas catalase e GPx são responsáveis por catalisar a redução do H₂O₂ (MICHIELS et al, 1994).

A catalase é uma heme proteína que catalisa a conversão do H₂O₂ em água e oxigênio (MICHIELS et al, 1994), e a GPx catalisa a redução do H₂O₂, tendo água como um dos produtos finais (MESSARAH et al, 2012). Dessa forma, após sessenta dias de tratamento, foi analisada a atividade dessas enzimas no sangue dos animais tratados e dos animais do grupo controle. A determinação da hemoglobina foi utilizada para normalizar os dados da catalase e da GPx.

A figura 7A mostra a atividade da catalase no sangue dos animais após a exposição às TiO₂ NPs e selênio. O tratamento somente com TiO₂ NPs não alterou a atividade da catalase, em relação ao grupo controle. Porém, no tratamento com TiO₂ NPs + selênio e no tratamento apenas com selênio, foi observado aumento na atividade dessa enzima em relação ao controle e ao grupo tratado apenas com TiO₂ NPs, sugerindo que o selênio foi o responsável pelo aumento da atividade dessa enzima.

Figura 7 - Análise das atividades das enzimas catalase (A) e GPx (B) em amostras de sangue dos animais tratados ou não com dióxido de titânio e/ou selênio.



Os resultados estão representados pela média \pm desvio-padrão. * $p < 0,05$ versus controle; # $p < 0,05$ versus grupo tratado com TiO₂ NPs. Fonte: elaborado pela autora.

Com relação à enzima glutationa peroxidase (GPx), foi analisada a atividade desta enzima no sangue dos animais dos grupos em estudo. Surpreendentemente, o tratamento com TiO₂ NPs, bem como com o selênio e sua associação com NPs, não alterou a atividade da enzima GPx (Figura 7B). Porém, alguns estudos têm mostrado um papel protetor antioxidante do selênio, pois o selênio é um componente importante de enzimas antioxidantes (EL-BAYOUMY, 2001), entre elas, a GPx (BRIGELIUS-FLORÉ, MAIORINO, 2013).

Em um estudo prévio realizado por nosso grupo, utilizando dose de TiO₂ NPs de 0,5 mg.kg⁻¹ para exposição de ratos durante 45 dias, não foi observada alteração nas atividades das enzimas catalase e GPx, quando comparadas ao grupo controle (MARTINS et al, 2017).

A dose utilizada pode ser a razão pela qual não foi observada alteração na atividade dessas enzimas no grupo tratado apenas com TiO₂ NPs em relação ao grupo controle. Meena & Paulraj (2012) mostraram que as doses de TiO₂ NPs administradas estão relacionadas com os efeitos das nanopartículas no sistema antioxidante, uma vez que nos grupos tratados com 5 mg.kg⁻¹ e 25 mg.kg⁻¹ a atividade da catalase e da GPx nos rins e no fígado não foi estatisticamente diferente em relação ao grupo controle. Todavia, ao se administrar uma dose maior (50 mg.kg⁻¹), ocorreu diminuição da atividade dessas enzimas nos tecidos

mencionados. O mesmo foi observado por Zhao et al (2010), onde, utilizando as doses de 10, 50, 100 e 150 mg.kg⁻¹, observaram que a atividade da catalase foi significativamente inibida nos rins de ratos tratados com TiO₂ NPs, sugerindo que, nessas doses, as TiO₂ NPs diminuem a atividade antioxidante enzimática.

Shakeel e colaboradores (2016) encontraram essa relação apenas nos grupos tratados com 150 mg.kg⁻¹. Além disso, estes autores observaram que nessa dose a atividade da catalase estava diminuída no fígado e sangue de ratos tratados com TiO₂ NPs, o que pode ser devido ao aumento da produção de H₂O₂ pela exposição às NPs.

O selênio é um elemento essencial e desempenha um papel antioxidante na exposição a metais (IKEMOTO et al, 2012).

Os resultados do presente estudo mostraram que a suplementação com selênio aumentou a atividade da enzima catalase em relação ao grupo controle e ao grupo tratado apenas com as NPs. Em um estudo realizado por Ansar e colaboradores (2016), observou-se que em ratos expostos à nanopartículas de prata, a administração de selênio aumentou a atividade da catalase, em relação ao grupo tratado apenas com as NPs. Bas; Kalender (2016) avaliaram o efeito protetor do selênio na nefrotoxicidade induzida por nitrato de chumbo, e relataram um aumento significativo na atividade da catalase e GPx na co-administração de chumbo e selênio, em relação ao grupo expostos apenas ao chumbo.

No presente trabalho não foi observado diminuição da atividade da GPx em consequência da exposição às TiO₂ NPs, tão pouco o aumento da atividade dessa enzima na presença de selênio. Em um estudo conduzido por Messarah et al (2012), o qual avaliaram o efeito protetor do selênio sobre o dano oxidativo produzido pelo arsênio, os pesquisadores mostraram que o tratamento apenas com o selênio não apresentou aumento na atividade da GPx em relação ao grupo controle. Resultado similar foi encontrado também por Soudani e colaboradores (2011). Ao investigar os efeitos do crômio e do selênio na função cardíaca, este mesmo grupo relatou que não houve diferença na atividade da GPx entre os grupos controle e selênio.

Em um estudo conduzido por Jia e colaboradores (2017), foi observado que após gavagem das TiO₂ NPs, na dose de 5 mg.kg⁻¹, por 60 dias, não ocorreu mudanças nos níveis de radical superóxido, H₂O₂ e MDA no fígado de camundongos tratados com TiO₂ NPs.

Assim, sugerimos que a genotoxicidade das TiO₂ NPs observada neste estudo não está relacionada à alterações de estado redox, principalmente vinculados à atividade das enzimas catalase e GPx.

6. CONCLUSÃO

As TiO₂ NPs se distribuem e acumulam em diferentes órgãos, após a exposição a doses relativamente baixas, como a do presente estudo. A não detecção do titânio no sangue dos animais sugere uma rápida meia-vida biológica neste compartimento, seguida de distribuição aos tecidos.

Embora não influencie na deposição das NPs nos diferentes órgãos, o selênio confere efeito protetor da genotoxicidade induzida pelas TiO₂ NPs nas células hepáticas e no tecido cerebral.

Este é o primeiro estudo, até onde vai nosso conhecimento, que avaliou possíveis efeitos protetores do selênio em ratos tratados com TiO₂ NPs. Dessa forma, novos estudos associando NPs e selênio podem ser realizados com a finalidade de analisar os efeitos protetores do selênio em modelo de toxicidade por NPs.

7. REFERÊNCIAS

ABARIKWU, S. O. et al. Selenium and rutin alone or in combination do not have stronger protective effects than their separate effects against cadmium-induced renal damage. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 5, p. 896-904, 2016.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121-126, 1984.

ALEHAGEN, U.; ALEXANDER, J.; AASETH, J. Supplementation with Selenium and Coenzyme Q10 Reduces Cardiovascular Mortality in Elderly with Low Selenium Status. A Secondary Analysis of a Randomised Clinical Trial. **Plos One**, v. 11, n. 7, p. e0157541, 2016.

ANSAR, S. et al. Antioxidant and hepatoprotective role of selenium against silver nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 7789-7797, 2017.

ANSAR, S. et al. Sodium Selenite Protects Against Silver Nanoparticle-Induced Testicular Toxicity and Inflammation. **Biological Trace Elements Research**, v. 175, n. 1, p. 161-168, 2016.

BAS, H.; KALENDER, Y. Nephrotoxic effect of lead nitrate exposure in diabetic and nondiabetic rats: involvement of oxidative stress and the protective role of sodium selenite. **Environmental Toxicology**, v. 31, n. 10, p. 1229-1240, 2016.

BATISTA, B. L. et al. Exploiting dynamic reaction cell inductively coupled plasma mass spectrometry (DRC-ICP-MS) for sequential determination of As, Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Pb, Se, Tl, V and Zn in whole blood using a dilute-and-shoot procedure. **Analytica Chimica Acta**, v. 639, p. 13-18, 2009a.

BATISTA, B. L. et al. Determination of trace elements in biological samples by inductively coupled plasma mass spectrometry with tetramethylammonium hydroxide solubilization at room temperature. **Analytica Chimica Acta**, v. 64, p. 23-29, 2009b.

BERGGREN, M. M. et al. Effects of selenium on rat thioredoxin reductase activity: increase by supranutritional selenium and decrease by selenium deficiency. **Biochemical Pharmacology**, v. 57, n. 2, p. 187-193, 1999.

BRAY, T. M. Dietary antioxidants and assessment of oxidative stress. **Nutrition**, v. 16, n. 7-8, p. 578-581, 2000.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; MAIORINO, M. Glutathione peroxidases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, n. 5, p. 3289-3303, 2013.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 27, n. 9-10, p. 951-965, 1999.

CHELIKANI, P.; FITA, I.; LOEWEN, P. C. Diversity of structures and properties among catalases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 61, n. 2, p. 192-208, 2004.

CHEN, J. et al. In vivo acute toxicity of titanium dioxide nanoparticles to mice after intraperitoneal injection. **Journal of Applied Toxicology**, v. 29, n. 4, p. 330-337, 2009.

CONTEMPRE, B. et al. Effects of selenium deficiency on thyroid necrosis, fibrosis and proliferation: a possible role in myxoedematous cretinism. **European Journal of Endocrinology**, v. 133, n. 1, p. 99-109, 1995.

CUI, Y. et al. Signaling pathway of inflammatory responses in the mouse liver caused by TiO₂ nanoparticles. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 96, n. 1, p. 221-229, 2011.

CURTIN, J.F.; DONOVAN, M.; COTTER, T. G. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. **Journal of Immunological Methods**, v. 265, n. 1-2, p. 49-72, 2002.

CZAJKA, M. et al. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles in central nervous system. **Toxicology in Vitro**, v. 29, n. 5, p. 1042-1052, 2015.

DEAGEN, J. T. et al. Determination of the distribution of selenium between glutathione peroxidase, selenoprotein P, and albumin in plasma. **Analytical Biochemistry**, v. 208, n. 1, p. 176-181, 1993.

EL-BAYOUMY, K. The protective role of selenium on genic damage and on cancer. **Mutation Research**, v. 475, n. 1-2, p. 123-139, 2001.

ELLWANGER, J. H. et al. Selenium reduces bradykinesia and DNA damage in a rat model of Parkinson's disease. **Nutrition**, v. 31, n. 2, p. 359-365, 2015.

ERKEKOGLU, P. et al. Protective effect of selenium supplementation on the genotoxicity of di(2-ethylhexyl)phthalate and mono(2-ethylhexyl)phthalate treatment in LNCaP cells. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 49, n. 4, p. 559-566, 2010.

FABIAN, E. et al. Tissue distribution and toxicity of intravenously administered titanium dioxide nanoparticles in rats. **Archives of Toxicology**, v. 82, n. 3, p. 151-157, 2008.

FAIRBAIRN, D. W.; OLIVE, P. L.; O'NEILL, K. L. The comet assay: a comprehensive review. **Mutation Research**, v. 339, n. 1, p. 37-59, 1995.

GERAETS, L. et al. Tissue distribution and elimination after oral and intravenous administration of different titanium dioxide nanoparticles in rats. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 11, p. 30, 2014.

GHOSH, M.; CHAKRABORTY, A.; MUKHERJEE, A. Cytotoxic, genotoxic and hemolytic effect of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles on human erythrocyte and lymphocyte cells in vitro. **Journal of Applied Toxicology**, v. 33, n. 10, p. 1097-1010, 2013.

GOTTSCHALK, F. et al. Engineered nanomaterials in water and soils: a risk quantification based on probabilistic exposure and effect modeling. **Environmental Toxicology Chemistry**, v. 32, n. 6, p. 1278-1287, 2013.

GRISSA, I. et al. The effect of titanium dioxide nanoparticles on neuroinflammation response in rat brain. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 20, p. 20205-20213, 2016.

GROTTO, D. et al. Low levels of methylmercury induce DNA damage in rats: protective effects of selenium. **Archives of Toxicology**, v. 83, n. 3, p. 249-254, 2009.

GURR, J. R. et al. Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. **Toxicology**, v. 213, n. 1-2, p. 66-73, 2005.

HARTMANN, A. et al. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. 4th International Comet Assay Workshop. **Mutagenesis**, v. 18, n. 1, p. 45-51, 2003.

HE, W. et al. Enzyme-like activity of nanomaterials. *Journal of Environmental Science Health Part C, Environmental Carcinogenesis & Ecotoxicology Reviews*, v. 32, n. 2, p. 186-211, 2014.

HERZOG, F. et al. Exposure of silver-nanoparticles and silver-ions to lung cells *in vitro* at the air-liquid interface. *Particle and Fibre Toxicology*, v. 10, p. 11 2013.

HONG, F. et al. Pulmonary fibrosis of mice and its molecular mechanism following chronic inhaled exposure to TiO₂ nanoparticles. [Epub ahead of print]. *Environmental Toxicology* 2017 Sep 25. doi: 10.1002/tox.22493. 2017a.

HONG, F. et al. Chronic nasal exposure to nanoparticulate TiO₂ causes pulmonary tumorigenesis in male mice. *Environmental Toxicology*, v. 32, n. 5, p. 1651-1657, 2017b.

HONG, J.; Zhang, Y. Q. Murine liver damage caused by exposure to nano-titanium dioxide. *Nanotechnology*, v. 27, n. 11, p. 112001, 2016.

HU, R. et al. Neurotoxicological effects and the impairment of spatial recognition memory in mice caused by exposure to TiO₂ nanoparticles. *Biomaterials*, v. 31, n. 31, p. 8043-8050, 2010.

HUSSAIN, S. et al. Carbon black and titanium dioxide nanoparticles elicit distinct apoptotic pathways in bronchial epithelial cells. *Particle and Fibre Toxicology*, v. 7, p. 10, 2010.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Carbon Black, Titanium Dioxide, and Talc. Lyon, France, v. 93, 2010.

IKEMOTO, T. et al. Detoxification mechanism of heavy metals in marine mammals and seabirds: interaction of selenium with mercury, silver, copper, zinc, and cadmium in liver. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 47, n. 3, p. 402-413, 2004.

JIA, X. et al. The potential liver, brain, and embryo toxicity of titanium dioxide nanoparticles on mice. *Nanoscale Research Letters*, v. 12, n. 1, p. 478, 2017.

JOSKO, I.; OLESZCZUK, P. Phytotoxicity of nanoparticles-problems with bioassay choosing and sample preparation. **Environmental Science and Pollution Research International**, v. 21, n. 17, p. 10215-10224, 2014.

KLAUNIG, J. E.; KAMENDULIS, K. M. The role of oxidative stress in carcinogenesis. **Annual Review Pharmacology and Toxicology**, v. 44, p. 239-267, 2004.

KREVLING, W. G. et al. Quantitative biokinetics of titanium dioxide nanoparticles after oral application in rats: Part 2. **Nanotoxicology**, v. 11, n. 4, p. 443-453, 2017.

KULKARNI, M. et al. Titanium nanostructures for biomedical applications. **Nanotechnology**, v. 26, n. 6, p. 062002, 2015.

LI, S. Q. et al. Impact and mechanism of TiO₂ nanoparticles on DNA synthesis *in vitro*. **Science in China Series B: Chemistry**, v. 51, n. 4, p. 367-372, 2008.

LI Y. et al. Genotoxicity and gene expression analyses of liver and lung tissues of mice treated with titanium dioxide nanoparticles. **Mutagenesis**, v. 32, n. 1, p. 33-46, 2017.

LU, S. C. Glutathione synthesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 183, p. 3143-3153, 2013.

LYNCH, S. J. et al. Selenium source impacts protection of porcine jejunal epithelial cells from cádmium-induced DNA damage, with maximum protection exhibited with yeast-derived selenium compounds. **Biological Trace Element Research**, v. 6, n. 2, p. 311-320, 2017.

MA L. et al. The acute liver injury in mice caused by nano-anatase TiO₂. **Nanoscale Research Letters**, v. 4, n. 11, p. 1275-1285, 2009.

MANKE, A.; Wang, L.; Rojanasakul, Y. Mechanisms of Nanoparticle-Induced Oxidative Stress and Toxicity. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.

MANO, S.S. et al. Effect of polyethylene glycol modification of TiO₂ nanoparticles on cytotoxicity and gene expressions in human cell lines. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 3, p. 3703-3717, 2012.

MARANO, F. et al. Nanoparticles: molecular targets and cell signaling. **Archives of Toxicology**, v. 85, n. 7, p. 733-741, 2011.

MARTINS, A. C. et al. Evaluation of distribution, redox parameters, and genotoxicity in Wistar rats co-exposed to silver and titanium dioxide nanoparticles. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 80, n. 19-21, p. 1156-1165, 2017.

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

McKelvey, S. M.; Horgan, K. A.; Murphy, R. A. Chemical form of selenium differentially influences DNA repair pathways following exposure to lead nitrate. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 29, p. 151-169, 2015.

MEENA, R.; PAULRAJ, R. Oxidative stress mediated cytotoxicity of TiO₂ nano anatase in liver and kidney of Wistar rat. **Toxicological & Environmental Chemistry**, v. 94, n. 1, p. 146-163, 2012.

MESSARAH, M. et al. Hepatoprotective role and antioxidant capacity of selenium on arsenic-induced liver injury in rats. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 64, n. 3, p. 167-174, 2012.

MICHIELS, C. et al. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 17, n. 3, p. 235-248, 1994.

MOHAMED, H. R.; HUSSIEN, N. A. Genotoxicity studies of titanium dioxide nanoparticles (TiO₂NPs) in the brain of mice. **Scientifica (Cairo)**, v. 2016, p. 6710840, 2016.

NIU, L. et al. Reduction of oxidative damages induced by titanium dioxide nanoparticles correlates with induction of the Nrf2 pathway by GSPE supplementation in mice. **Chemico-Biological Interactions**, v. 275, p. 133-144, 2017.

OECD n^o 489. Guideline for the testing of chemicals *in vivo* mammalian alkaline comet assay, 2014.

PAGLIA, D. E.; VALENTINE, W. N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxide. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 70, n. 1, p. 158-169, 1967.

PAPP, L. V. et al. From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 9, n. 7, p. 775-806, 2007.

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

PUJALTÉ, I. et al. Toxicokinetics of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles after inhalation in rats. **Toxicology Letters**, v. 265, p. 77-85, 2017.

READ, R. et al. Selenium and amino acid composition of selenoprotein P, the major selenoprotein in rat serum. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 29, p. 17899-17905, 1990.

RECORDATI, C. et al. Tissue distribution and acute toxicity of silver after single intravenous administration in mice: nano-specific and size-dependent effects. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 13, p. 12, 2016.

RELIER, C. et al. Study of TiO₂ P25 nanoparticles genotoxicity on lung, blood, and liver cells in lung overload and non-overload conditions after repeated respiratory exposure in rats. **Toxicological Sciences**, v. 156, n. 2, p. 527-537, 2017.

SAITO, Y.; TAKAHASHI, K. Characterization of selenoprotein P as a selenium supply protein. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, n. 22, p. 5746-5751, 2002.

SANNADI, S.; KADEYALA, P. K.; GOTTIPOLU, R. R. Reversal effect of monoisoamyl dimercaptosuccinic acid (MiADMSA) for arsenic and lead induced perturbations in apoptosis and antioxidant enzymes in developing rat brain. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 31, n. 7, p. 586-597, 2013.

SHA, B. et al. Cytotoxicity of titanium dioxide nanoparticles differs in four liver cells from human and rat. **Composites Part B: Engineering**, v. 42, n. 8, p. 2136-2144, 2011.

SHAKEEL, M. et al. Toxic effects of titanium dioxide nanoparticles and titanium dioxide bulk salt in the liver and blood of male Sprague-Dawley rats assessed by different assays. **Biological Trace Element Research**, v. 173, n. 2, p. 405-426, 2016.

SHI, H. et al. Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 10, p. 15, 2013.

SHINOHARA, N. et al. Tissue distribution and clearance of intravenously administered titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles. **Nanotoxicology**, v. 8, n. 2, p. 132-141, 2014.

SHUKLA, R. K. et al. Titanium dioxide nanoparticle-induced oxidative stress triggers DNA damage and hepatic injury in mice. **Nanomedicine (Lond)**, v. 9, n. 9, p. 1423-1434, 2014.

SHUKLA, R. K, et al. TiO₂ nanoparticles induce oxidative DNA damage and apoptosis in human liver cells. **Nanotoxicology**, v. 7, n. 1, p. 48-60, 2013.

SINGH, N. P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, n. 1, p. 184-191, 1988.

SONAVANE, G.; TOMODA, K.; MAKINO, K. Biodistribution of colloidal gold nanoparticles after intravenous administration: effect of particle size. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 66, n. 2, p. 274-280, 2008.

SOUDANI, N. et al. Cardioprotective effects of selenium on chromium (VI)-induced toxicity in female rats. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 3, p. 513-520, 2011.

STHIJNS, M. M. et al. Time in Redox Adaptation Processes: From Evolution to Hormesis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 10, p. 1649, 2016.

SUN, L. H. et al. Prevention of aflatoxin B1 hepatotoxicity by dietary selenium is associated with inhibition of cytochrome P450 isozymes and up-regulation of 6 selenoprotein genes in chick liver. **Journal of Nutrition**, v. 146, n. 4, p. 655-661, 2016.

SYCHEVA, L. P. et al. Investigation of genotoxic and cytotoxic effects of micro- and nanosized titanium dioxide in six organs of mice in vivo. **Mutation Research**, v. 726, n. 1, p. 8-14, 2011.

TASSINARI, R. et al. Oral, short-term exposure to titanium dioxide nanoparticles in Sprague-Dawley rat: focus on reproductive and endocrine systems and spleen. **Nanotoxicology**, v. 8, n. 6, p. 654-662, 2014.

THANNICKAL, V.; FANBURG, B. L. Reactive oxygen species in cell signaling. **The American Journal of Physiology Lung Cellular Molecular Physiology**, v. 279, n. 6, p. 1005-1028, 2000.

TIAN, L. et al. Stimuli-Responsive Gold Nanoparticles for Cancer Diagnosis and Therapy. **Journal of Functional Biomaterials**, v. 7, n. 3, p. 19, 2016.

TICE, R. R. et al. Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, n. 3, p. 206-221, 2000.

TROUILLER, B. et al. Titanium dioxide nanoparticles induce DNA damage and genetic instability in vivo in mice. **Cancer Research**, v. 69, n. 22, p. 8784-8789, 2009.

TURANOV, A. A. et al. Biosynthesis of selenocysteine, the 21st amino acid in the genetic code, and a novel pathway for cysteine biosynthesis. **Advances in Nutrition**, v. 2, n. 2, p. 122-128, 2011.

VALDIGLESIAS, V. et al. Comparative study on effects of two different types of titanium dioxide nanoparticles on human neuronal cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 57, p. 352-361. 2013.

VASANTHARAJA, D.; RAMALINGAM, V.; REDDY, G. A. Oral toxic exposure of titanium dioxide nanoparticles on serum biochemical changes in adult male Wistar rats. **Nanomedicine Journal**, v. 2, n. 1, p. 46-53, 2014.

WANG, J. et al. Potential neurological lesion after nasal instillation of TiO₂ nanoparticles in the anatase and rutile crystal phases. **Toxicology Letters**, v. 183, n. 1-3, p. 72-80, 2008.

WANG, J. et al. Acute toxicity and biodistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration. **Toxicology Letters**, v. 168, n. 2, p. 176-185, 2007.

WEIR, A. et al. Titanium dioxide nanoparticles in food and personal care products. **Environmental Science & Technology**, v. 46, p. 2242-2250, 2012.

WHO, FAO. Guidelines on food fortification with micronutrients. WHO Library Catalogue-in-Publication Data. 2006.

WU, J. et al. Toxicity and penetration of TiO₂ nanoparticles in hairless mice and porcine skin after subchronic dermal exposure. **Toxicology Letters**, v. 191, n. 1, p. 1-8, 2009.

YU, Y.; Ren, W.; Ren, B. Nanosize titanium dioxide cause neuronal apoptosis: a potential linkage between nanoparticle exposure and neural disorder. **Neurological Research**, v. 30, n. 10, p. 1115-1120, 2008.

ZHANG, Q. et al. Differences in inflammation caused by intratracheal exposure to three ultrafine metals: role of free radicals. **Journal of Environmental Health Part A**, v. 53, n. 6, p. 423-438, 1998.

ZHAO, J. et al. The mechanism of oxidative damage in the nephrotoxicity of mice caused by nano-anatase TiO₂. **Journal of Experimental Nanoscience**, v. 5, n. 5, p. 447-462, 2010.

ZHAO, X. et al. Nanosized TiO₂-induced reproductive system dysfunction and its mechanism in female mice. **Plos One**, v. 8, n. 4, p. e59378, 2013.

ZHU, R. R. et al. A novel toxicological evaluation of TiO₂ nanoparticles on DNA structure. **Chinese Journal of Chemistry**, v. 25, n. 7, p. 958-961, 2007.

ANEXO

ANEXO 1 – Aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação da toxicidade de nanopartículas de dióxido de titânio(TiO_2) e possível efeito protetor do selênio em ratos *Wistar*", protocolo nº 15.1.964.60.0, sob a responsabilidade de Cecília Cristina de Souza Rocha e Fernando Barbosa Junior que envolve manutenção e utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (CEUA FCFRP) na reunião de 28/01/2016.

Colaboradores: Maria Fernanda Hornos Carneiro, Airton da Cunha Martins Junior e Lara Ferreira Azevedo.

Vigência do Projeto	Dezembro/2015 a Maio/2017
Espécie/Linhagem	Rato heterogênico <i>Wistar</i>
Nº de animais	24
Peso/Idade	120g / 5 semanas
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central da PUSP-RP

Ribeirão Preto, 11 de fevereiro de 2016.


Profa. Dra. Ana Patrícia Yatsuda Natsui
Presidente da CEUA-FCFRP