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

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 gastrointestinal 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 mantêm seu estado redox. As enzimas catalase (CAT) e glutathione 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.

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 (GOTTSCALK 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 TiO_2 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 TiO_2 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 TiO_2 NPs, atingiram diferentes tecidos e induziram lesões em vários órgãos. Já por administração oral, TiO_2 NPs também atingiram outros órgãos, como cérebro (HU et al, 2010), rim, baço, pulmão (WANG et al, 2007) e fígado (CUI, 2011).

As TiO_2 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 TiO_2 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 TiO_2 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 TiO_2 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 consequentemente 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 TiO_2 NPs.

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 diferente 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 patial 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 Carcionogenic 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 nº 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 heterogêneo <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