

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM SAÚDE**

Michele Munk Pereira

**Avaliação da toxicidade de nanomateriais em diferentes modelos biológicos e aplicações
na transfecção gênica**

**Juiz de Fora
2013**

Michele Munk Pereira

**Avaliação da toxicidade de nanomateriais em diferentes modelos biológicos e aplicações
na transfecção gênica**

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-graduação em Saúde - Área de concentração em Saúde Brasileira da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Saúde.

Orientadora: Dra. Nádia Rezende Barbosa Raposo

Co-orientador: Dr. Humberto de Mello Brandão

Juiz de Fora

2013

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Pereira, Michele Munk .

Avaliação da toxicidade de nanomateriais em diferentes modelos biológicos e aplicações na transfecção gênica / Michele Munk Pereira. -- 2013.

164 f. : il.

Orientador: Nádia Rezende Barbosa Raposo

Coorientador: Humberto de Mello Brandão

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Saúde Brasileira, 2013.

1. Nanotubos de Carbono. 2. Nanofibras de Celulose. 3. Nanotoxicologia. 4. Carreamento gênico. I. Raposo, Nádia Rezende Barbosa , orient. II. Brandão, Humberto de Mello, coorient. III. Título.

Michele Munk Pereira

**Avaliação da toxicidade de nanomateriais em diferentes modelos biológicos e aplicações
na transfecção gênica**

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-graduação em Saúde - Área de concentração em Saúde Brasileira da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Saúde.

Aprovada em:

BANCA EXAMINADORA

Dra. Nádia Rezende Barbosa Raposo - Orientadora
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dr. Marcos Antônio Fernandes Brandão
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dr. Carlos Magno da Costa Maranduba
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dra. Roberta Brayner
Universidade Paris Diderot 7

Dra. Raquel Varella Serapião
Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-graduação em Saúde da Universidade Federal de Juiz de Fora, pela oportunidade de realizar o curso de doutorado.

À *Embrapa Gado de Leite*, pela infraestrutura que possibilitou a realização dos experimentos. A *CAPES*, pela concessão de bolsa de doutorado (Rede Nanobiotec-Brasil - Edital CAPES 04/CII-2008).

Ao programa *Ciências Sem Fronteiras* pela concessão de bolsa de estudo (CNPq) para período de doutorado sanduíche na França.

Ao *CNPq*, à *FINEP*, à *FAPEMIG* e à *Rede AgroNano* pelo apoio financeiro na condução dos estudos.

À Dra. *Nádia Rezende Barbosa Raposo* pela oportunidade e pelos ensinamentos ao longo do curso de doutorado.

Ao Dr. *Humberto de Mello Brandão* pelas orientações, pela confiança e por permitir que eu expandisse meus conhecimentos estudando uma nova ciência: a Nanotecnologia.

Ao Dr. *Luiz Sérgio de Almeida Camargo*, pela orientação e pelos ensinamentos ao longo da minha formação acadêmica.

À Dra. *Roberta Brayner*, pela oportunidade e acolhida, assim como a supervisão durante o estágio sanduíche no laboratório ITODYS.

Ao Prof. Dr. *Carlos Magno da Costa Maranduba*, meu professor na saudosa disciplina de Bioengenharia Tecidual, agradeço pelos ensinamentos.

À Dra. *Raquel Varella Serapião* por ter participado da minha formação científica inicial.

Ao Prof. Dr. *Marcos Brandão*, pelas contribuições na qualificação e por aceitar compor a minha banca de defesa de doutorado.

Aos amigos da *Embrapa Gado de Leite*, *Carolina*, *Eliza*, *Fernanda*, *Joel* e *Myro* no auxílio para a condução das atividades laboratoriais, pela amizade e trabalho em equipe.

Aos funcionários e alunos do laboratório ITODYS, *Ludovic*, *Alice*, *Marina*, *Nada*, *Rhym* pelo auxílio nos experimentos e pela agradável convivência durante a minha estadia em Paris.

Aos amigos feitos na *Maison du Brésil*, *Tanja*, *Felipe*, *Monize*, *Jane*, *Júnior*, *Hind*, *Mari*, *Mariana* e *Aline* pelos momentos de descontração.

À minha família, por acreditarem em mim e compreenderem minha ausência.

A todos os meus amigos que me incentivaram.

A *Deus*, por sempre estar ao meu lado.

“Determinação, coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso. Se estamos possuídos por uma inabalável determinação conseguiremos superá-los. Independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho.”

Dalai Lama

RESUMO

Os nanotubos de carbono multicamadas (MWCNT) e as nanofibras de celulose (NFCs) são interessantes nanomateriais (NMs) que possuem grande potencial de aplicação em áreas como tratamento de água, reforço de materiais, engenharia tecidual e entrega de moléculas terapêuticas. Em especial, os MWCNT são promissores vetores de DNA em células e embriões de mamíferos. Porém, o desenvolvimento desta área está relacionado à padronização de sistemas para avaliar o potencial impacto dos NMs na saúde humana e ambiental. O objetivo geral deste estudo foi avaliar a toxicidade de MWCNT e NFC em diferentes modelos biológicos (fibroblastos e embriões bovinos; microalgas) e o potencial de carreamento gênico de MWCNT-COOH em fibroblastos e embriões bovinos. No experimento 1, foi avaliada a viabilidade e a morfologia dos fibroblastos cultivados *in vitro* expostos às NFCs e aos MWCNT-COOHs. Os resultados deste experimento revelaram que em baixas concentrações ($0,02-100\mu\text{g ml}^{-1}$) as NFC não foram citotóxicas ($P = 0,06$). Porém, concentrações acima de $200\mu\text{g ml}^{-1}$ NFC diminuíram a viabilidade celular e causaram mudanças na morfologia das células. Para os MWCNT-COOH, a exposição dos fibroblastos a $100\mu\text{g ml}^{-1}$ reduziram a viabilidade ($P= 0,001$) e alteram a morfologia celular. No experimento 2, foram analisados os efeitos desses NMs no desenvolvimento, expressão gênica e apoptose *in situ* de embriões bovinos produzidos *in vitro*. Neste ensaio, os NMs não influenciaram o desenvolvimento ($P=0,24$) e o índice de apoptose embrionária ($P=0,82$). Contudo, os MWCNT-COOH alteraram a expressão de genes ($P=0,02$) relacionados à totipotência, diferenciação e estresse celular de forma mais acentuada quando comparada às NFCs. No experimento 3, o potencial ecotóxico das NFCs e dos MWCNTs foi estudado em microalgas *Chlorella vulgaris* e *Klebsormidium flaccidum* mediante análise de Potencial Zeta, viabilidade celular, atividade fotossintética e de enzimas antioxidativas, quantificação dos níveis de ATP e microscopia eletrônica. Os resultados revelaram que os MWCNTs e as NFCs afetaram a viabilidade ($P<0,001$), a fotossíntese ($P<0,05$), a atividade de enzimas antioxidativas ($P<0,05$), os níveis de ATP ($P<0,05$) e a morfologia celular das microalgas em concentrações, tempos e sistemas de cultura específicos. No experimento 4, os fibroblastos e embriões bovinos foram transfectados com MWCNT-COOH complexados ao plasmídeo contendo o gene que codifica a proteína verde fluorescente (pGFP). As análises de microscopia de fluorescência detectaram que o gene GFP foi expresso nas células e nos embriões no estágio inicial de desenvolvimento (2 a 8 células). Entretanto, a expressão de GFP não foi observada no estágio de blastocisto. A análise por PCR confirmou a presença do gene GFP nos fibroblastos (3,30% GFP+) e

embriões de 2-8-células (46,67% GFP+). Em conclusão, nas condições testadas, a exposição de fibroblastos a baixas concentrações de MWCNT-COOH ou NFC não causaram impacto na viabilidade e morfologia celular. Entretanto, os MWCNTs e as NFCs foram citotóxicas para as microalgas estudadas. O uso de MWCNT-COOH como vetor de DNA em embriões bovinos mostrou-se promissora, o que abre possibilidades de geração de animais transgênicos por este método.

Palavras-chave: Nanotubos de Carbono, Nanofibras de Celulose, Nanotoxicologia, Carreamento gênico.

ABSTRACT

Multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) and cotton cellulose nanofibers (CNFs) are interesting nanomaterials (NMs) which possess great potential for applications in various fields such as in water treatment, reinforcement materials, tissue engineering and therapeutic molecule delivery. In particular, MWCNT have emerged as a new method for gene delivery and they can be an alternative for cell and embryos transfection. However, while engineered NMs provide great benefits, we know very little about the potential effects on human health and the environment. Thus, the objectives of this study were to evaluate the potential toxicity of MWCNT and CNF in various biological model organisms (bovine fibroblast and embryo, and green microalgae) and whether MWCNT is able to deliver exogenous DNA molecules into bovine fibroblast and embryos. In experiment 1, we evaluated in vitro the effects of NMs on bovine fibroblast viability and morphology. The results showed that low concentrations of CNF ($0.02\text{-}100\mu\text{g ml}^{-1}$) did not cause viability loss ($P>0.05$) or change in cell morphology. However, at concentrations above $200\mu\text{g ml}^{-1}$, NFC significantly decreased cell viability ($P<0.05$) and changes in cell shape. Fibroblasts exposed at concentrations above $100\mu\text{g ml}^{-1}$ MWCNT-COOH exhibited a reduced cell viability ($P<0.05$) and their cell morphology was altered. In experiment 2, we examined gene expression, apoptosis response and developmental rates of in vitro produced bovine embryos that were exposed to NMs. There was no difference ($P > 0.05$) in the hatching, degeneration and apoptosis rate among the control, MWCNT-COOH or cotton CNF- exposed embryos. In contrast, in embryos exposed at $0.2\ \mu\text{g ml}^{-1}$ MWCNT-COOH showed relatively higher levels ($P<0.05$) of the genes associated with totipotency, differentiation and response to stress. In experiment 3, we analyzed the cytotoxic response of *C. vulgaris* and *K. flaccidum* cells (green microalgae) to NMs by investigating the zeta potential, trypan blue exclusion assay, photosynthetic activity, superoxide dismutase activity, quantification of ATP levels and microscopic investigations. NMs decreased viability, photosynthetic activity and ATP levels of microalgae cells, depending on concentration and time. Addition of NMs further induced an increase of superoxide dismutase activity and ultrastructural damage cell. In experiment 4, we have used plasmid DNA of green fluorescent protein (pGFP) in combination with MWCNT-COOH to transfect bovine fibroblast and embryos. Detection of GFP accumulation by fluorescence microscopy examination revealed that this gene was expressed in the fibroblast and the embryo (2 to 8-cell stage). However, the expression GFP was not observed in blastocyst stage. The PCR result confirmed the presence of the pGFP gene in the transfected cells

(3.30% GFP+) and embryos of 2-8-cell stage (46.67% GFP+). In conclusion, under the conditions tested, the exposures to MWCNTs or CNFs in low concentrations are not toxic to bovine fibroblast cells. However, these NMs have toxic effects in green microalgae. Especially, this work showed that MWCNT-COOH-transfection of embryo could be a simple and suitable method to introduce foreign genes in embryos and perhaps could be also useful to generate transgenic animals.

Keywords: Carbon nanotubes. Cellulose nanofibers. Nanotoxicity. Gene delivery

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	A escala nanométrica dos materiais.....	25
Figura 2 -	Diagrama esquemático demonstrando as principais formas dos nano-objetos.....	25
Figura 3 -	Estrutura de nanofibras de celulose.....	28
Figura 4 -	Alótropos de carbono em diferentes estruturas.....	30
Figura 5 -	Esquema de nanotubos de carbono.....	30
Figura 6 -	Interação de nanomateriais com as células: alvos intracelulares e mecanismos anotoxicológicos.....	34
Figura 7-	Interações entre NTC e DNA ou entre NTC e proteínas.....	45
Figura 8-	Desenho geral dos estudos de toxicidade <i>in vitro</i> de NFCs e MWCNTs em diferentes modelos biológicos: fibroblastos e embriões bovinos e microalgas de água doce (<i>Chlorella vulgaris</i> e <i>Klebsormidium flaccidum</i>)...	49
Figura 9-	Desenho geral dos estudos de transfecção gênica utilizando MWCNT-COOH em fibroblastos e embriões bovinos.....	49
Figura 10-	Mapa do vetor plasmidial pLGW (pGFP).....	64
Figura 11-	Gel de agarose 0,8% em TAE mostrando a digestão do plasmídeo pLGW com diferentes enzimas de restrição.....	66
Figura 12-	Micrografias de microscopia eletrônica de transmissão de MWCNT-COOHs e NFC.....	71
Figura 13-	Curvas TG e DTG para as fibras de celulose, nanofibras secas em estufa e nanofibras liofilizadas.....	72
Figura 14-	Curvas TG e DTG para os MWCNT-COOHs.....	73
Figura 15-	Análise da viabilidade celular de fibroblastos expostos as NFCs por citometria de fluxo.....	74
Figura 16-	Análise da viabilidade celular de fibroblastos expostos aos MWCNTs por citometria de fluxo.....	75
Figura 17-	Fotomicrografias de fibroblastos bovinos incubados por 24 h com diferentes concentrações de NFC.....	78
Figura 18-	Fotomicrografias de fibroblastos bovinos incubados por 24 h com diferentes concentrações de MWCNT-COOH.....	79

Figura 19-	Influência de diferentes concentrações de NFCs sobre a morfologia de fibroblastos bovinos após 24h de cultura <i>in vitro</i>	81
Figura 20-	Influência de diferentes concentrações de MWCNT-COOHs sobre a morfologia de fibroblastos bovinos após 24h de cultura <i>in vitro</i>	82
Figura 21-	Expressão relativa (média±EP) dos transcritos para <i>Octamero-binding transcription factor 4</i> (OCT4), Histona deacetilase 1 (HDAC1) Peroxiredoxina 1 (PRDX1), <i>Heat shock protein 70.1</i> (HSP70.1) e <i>B cell leukemia 2 associated X protein</i> (BAX) em embriões bovinos cultivados sem nanomateriais (grupo controle) e com 0,2 µg ml ⁻¹ de NFCs ou MWCNT-COOHs.....	85
Figura 22-	Fotomicrografias de embriões bovinos expostos a diferentes nanomateriais.....	88
Figura 23-	Detecção da fragmentação do DNA pela técnica de TUNEL em blastocistos bovinos cultivados por 72h sem nanomateriais e com NFCs ou MWCNT-COOHs.....	90
Figura 24-	Difratogramas de raio X de MWCNT (A) e NFC (B).....	93
Figura 25-	Variação do Potencial Zeta na solução de <i>C. vulgaris</i> expostas a MWCNTs em meio de cultura BB ou água do Rio Sena em diferentes pHs.....	94
Figura 26-	Variação do Potencial Zeta na solução de <i>C. vulgaris</i> expostas a NFC em meio de cultura BB ou água do Rio Sena em diferentes pH.....	95
Figura 27-	Variação do Potencial Zeta na solução de <i>K. flaccidum</i> expostas a MWCNT e NFC.....	96
Figura 28-	Efeito de NMs no crescimento de <i>C. vulgaris</i> em meio de cultura BB ou água do Rio Sena.....	98
Figura 29-	Efeito de NMs no crescimento de <i>K. flaccidum</i> em meio de cultura BB.....	99
Figura 30-	Viabilidade celular de microalgas <i>C. vulgaris</i> expostas a diferentes concentrações de MWCNT e NFC em função do tempo em meio de cultura BB ou água do Rio Sena.....	100
Figura 31-	Viabilidade celular de microalgas <i>K. flaccidum</i> expostas a diferentes concentrações de MWCNT e NFC em função do tempo em meio BB.....	101
Figura 32-	Fotomicrografias de <i>C. vulgaris</i> após 24 h de exposição a 100 µg ml ⁻¹ MWCNT ou NFC.....	102
Figura 33-	Fotomicrografias de <i>K. flaccidum</i> após 24 h de exposição a 100 µg ml ⁻¹	

	MWCNT ou NFC em meio de cultura BB.....	103
Figura 34-	Eficiência quântica máxima do fotossistema II (Fv/Fm) de <i>C. vulgaris</i> submetida a diferentes concentrações de MWCNT e NFC em função do tempo em meio de cultura BB ou água do Rio Sena.....	105
Figura 35-	Eficiência quântica máxima do fotossistema II (Fv/Fm) de <i>K. flaccidum</i> submetida a diferentes concentrações de MWCNT e NFC em função do tempo em meio de cultura BB.....	106
Figura 36-	Conteúdo de ATP em células das microalgas <i>C. vulgaris</i> expostas a diferentes concentrações de MWCNT e NFC em função do tempo em meio de cultura BB ou água do Rio Sena.....	111
Figura 37-	Conteúdo de ATP em células das microalgas <i>K. flaccidum</i> expostas a diferentes concentrações de MWCNT e NFC em função do tempo em meio de cultura BB.....	112
Figura 38-	Micrografia eletrônica de varredura de células de <i>C. vulgaris</i> e <i>K. flaccidum</i> expostas a 100 µg ml ⁻¹ de MWCNT ou NFC por 48 h.....	113
Figura 39-	Micrografia eletrônica de transmissão de <i>C. vulgaris</i> e <i>K. flaccidum</i> expostas a 100 µg ml ⁻¹ de MWCNT ou NFC após 48 h.....	115
Figura 40-	Gel de agarose a 0,8% corado com brometo de etídeo para análise da interação de agentes transfectantes (MWCNT-COOH e PEI) e DNA plasmidial (pGFP).....	118
Figura 41-	Capacidade de transfecção de MWCNT-CHOO e PEI em fibroblastos bovinos cultivados <i>in vitro</i> com o plasmídeo pLGW (pGFP).....	120
Figura 42-	Porcentagem de células GFP positivas (GFP+) analisadas por citometria de fluxo 48 h pós-transfecção utilizando MWCNT-COOH ou polietilenoimina (PEI).....	121
Figura 43-	Curvas de dissociação do gene GFP em fibroblastos bovinos obtidas após amplificação por PCR em tempo real e gel de agarose mostrando a presença do gene GFP.....	124
Figura 44-	Capacidade de transfecção de MWCNT em embriões bovinos (estágio 2 a 8 células) cultivados <i>in vitro</i> com o plasmídeo pLGW (relação 20:1).....	125
Figura 45-	Curvas de dissociação do gene GFP em embriões bovinos obtidas após amplificação por PCR em tempo real e gel de agarose mostrando a presença do gene GFP.....	127

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequência dos <i>primers</i> específicos, temperaturas de pareamento, tamanho dos produtos e fonte de acesso às sequências no <i>GenBank</i>	57
Tabela 2 - Taxa de eclosão e degeneração de embriões bovinos cultivados <i>in vitro</i> expostos a 0,2 µg ml ⁻¹ de NFC ou MCWNT-COOH por 72 h.....	84
Tabela 3 - Efeito das NFCs e dos MWCNT-COOHs (0,2 µg ml ⁻¹) no número total de células e apoptose em embriões produzidos <i>in vitro</i>	90
Tabela 4 - Atividade da enzima antioxidativa SOD em microalgas unicelulares <i>C. vulgaris</i> expostas aos MWCNTs ou às NFCs em diferentes sistemas de cultivo <i>in vitro</i>	109
Tabela 5 - Atividade da enzima antioxidativa SOD em microalgas filamentosas <i>K. flaccidum</i> expostas aos MWCNTs ou às NFCs em diferentes sistemas de cultivo <i>in vitro</i>	110
Tabela 6 - Resumo geral dos principais resultados dos testes de citotoxicidade para <i>C. vulgaris</i> e <i>K. flaccidum</i> expostas aos MWCNT ou às NFCs comparados aos grupo controle	118
Tabela 7 - Porcentagem de embriões GFP positivos (GFP+) 72h pós-transfecção com concentrações diferentes de MCWNT-COOH conjugados aos pGFP.....	128

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
BAX	<i>B cell leukemia 2 associated X protein</i>
BB	<i>Bold's Basal</i>
β-ME	β-mercaptoetanol
BSA	Albumina Sérica Bovina
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
CL50	Concentração letal mediana
CMVP	Promotor citomegalovírus
CR2aa	<i>Charles Rosenkran's 2 amino acid</i>
DAPI	<i>4'6-diamidino-2-phenylindole</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNase	Desoxirribonuclease
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DRX	Difração de raio X
DTG	Termogravimetria derivada
dUTP	Desoxiuridina-5'-trifosfato
EP	Erro padrão
ERO	Espécies reativas de oxigênio
F0	Fluorescência inicial
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
FM	Fluorescência máxima
FSC	<i>Forward Scatter Signal</i>
FSH	Hormônio folículo estimulante
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GPS	Sistema de Posicionamento Global
HAD1	Histona deacetilase
HDAC1	Histona deacetilase 1

HSP70.1	<i>Heat shock protein 70.1</i>
ICSI	Injeção intracitoplasmática de espermatozoides
IP	Iodeto de Propídeo
iRNA	Ácido Ribonucleico de interferência
ISO	Organização Internacional de Normalização
LB	Luria Bertani
NFC	Nanofibras de celulose
NM	Nanomateriais
NTC	Nanotubos de carbono
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
MWCNT	<i>Multi-wall carbon nanotubes</i>
NIQUA	Núcleo de Identificação e Quantificação Analítica
NaCl	Cloreto de Sódio
OCT4	<i>Octamero-binding transcription factor 4</i>
PAM	Amplitude de pulso modulado
PBS	Solução salina fosfatada e tamponada
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PEI	Polímero catiônico polietilenoimina
pGFP	Plasmídeos marcados com GFP
pH	Potencial hidrogeniônico
PRDX1	Peroxiredoxina 1
PZ	Potencial Zeta
REST	<i>Relative Expression Software Tool</i>
RNA	Ácido Ribonucleico
RNAse	Ribonuclease
RPM	Rotação por minuto
rTdT	<i>recombinant terminal deoxynucleotidyl transferase</i>
SFB	Soro fetal bovino
SOB	Caldo de Hanahan
SOD	Superóxido Dismutase
SSC	<i>Side Scatter Signal</i>

SWCNT	<i>Single-walled carbon nanotubes</i>
SAS	Sistema de análise estatística
SNK	<i>Student Newman Keus</i>
Taq DNA	DNA polimerase derivada da <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris borato etilenodiamino tetra-acético
TCM 199	Meio para cultura de tecido
<i>TdT</i>	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase</i>
TG	Termogravimetria
TNCS	Transferência nuclear com células somáticas
TUNEL	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling</i>
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UFSC	Universidade Federal de São Carlos
WinMDI	<i>Windows Multiple Document Interface for Flow Cytometry</i>
WST	<i>Water-soluble tetrazolium salt</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

Ag	Prata
BamHI	Enzima de restrição derivada de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
Ca ²⁺	Íon cálcio
COOH	Carboxila
CO ₂	Dióxido de carbono
FL1	Canal de detecção da fluorescência laranja, classificada como fluorescência do tipo 1 nos ensaios de citometria de fluxo
FL2	Canal de detecção da fluorescência verde, classificada como fluorescência do tipo 2 nos ensaios de citometria de fluxo
Fv/Fm	Eficiência quântica potencial do fotossistema II
HNO ₃	Ácido nítrico
Na ⁺	Íon sódio
N ₂	Nitrogênio
NCOI	Enzima de restrição derivada de <i>Nocardia corallina</i>
OH ⁻	Hidroxila
O ₂ ⁻	Superóxido
TiO ₂	Dióxido de titânio
ZnO	Óxido de zinco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
1.1	NANOTECNOLOGICA.....	24
1.1.1	Definição de nanotecnologia	24
1.1.2	Iniciativas globais	26
1.2	NANOFIBRAS DE CELULOSE.....	28
1.3	NANOTUBOS DE CARBONO.....	29
1.4	POTENCIAL TÓXICO DOS NANOMATERIAIS.....	32
1.4.1	Nanotoxicidade	32
1.4.2	Propriedades físico-químicas de nanomateriais: efeitos biológicos	32
1.4.3	Rotas de exposição à nanomateriais e risco para a saúde pública	36
1.4.4	Nanotecnologia e implicações ambientais	37
1.4.5	Modelos de estudo de toxicidade	38
1.5	APLICAÇÕES POTENCIAIS DOS NANOMATERIAIS.....	41
1.5.1	Eletrônica, energia e ambiente	41
1.5.2	Agronegócio	41
1.5.3	Medicina e indústria farmacêutica	42
1.6	NANOTUBOS DE CARBONO COMO CARREADORES GÊNICOS.....	43
2	HIPÓTESES	47
3	OBJETIVOS	48
3.1	OBJETIVO GERAL	48
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	48
3.2.1	Estudos de toxicidade	48
3.2.2	Ensaio de transfecção gênica	48
4	MATERIAL E MÉTODOS	49
4.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	49
4.2	EXPERIMENTO 1 - AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA CITOTOXICIDADE DE NFC E MWCNT-COOH EM FIBROBLASTOS BOVINOS	51
4.2.1	Reagentes	51
4.2.2	Caracterização dos nanomateriais	51
4.2.2.1	<i>Microscopia eletrônica de transmissão (MET)</i>	51
4.2.2.2	<i>Análise Termogravimétrica (TG) e Termogravimétrica Derivada (DTG)</i>	51

4.2.3	Dispersão dos nanomateriais em meio de cultura celular	52
4.2.4	Cultura de células de fibroblastos.....	52
4.2.5	Exposição dos fibroblastos aos nanomateriais	52
4.2.6	Avaliação da viabilidade e morfologia celular por citometria de fluxo ..	53
4.2.7	Avaliação por microscopia de luz	54
4.2.8	Análises estatísticas	54
4.3	EXPERIMENTO 2 - EMBRIOTOXICIDADE DE NFC E MWCNT-COOH EM EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS <i>IN VITRO</i>	54
4.3.1	Dispersão dos nanomateriais em meio de cultivo embrionário	54
4.3.2	Produção <i>in vitro</i> de embriões	54
4.3.2.1	<i>Maturação in vitro (MIV).....</i>	54
4.3.2.2	<i>Fecundação in vitro (FIV).....</i>	55
4.3.2.3	<i>Cultivo in vitro (CIV) e exposição aos nanomateriais</i>	55
4.3.3	Avaliação da taxa de eclosão e degeneração	55
4.3.4	Expressão gênica por reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real.....	56
4.3.4.1	<i>Extração de RNA e síntese de DNA complementar (cDNA)</i>	56
4.3.4.2	<i>PCR em tempo real</i>	57
4.3.5	Índice apoptótico embrionário (TUNEL)	58
4.3.6	Análises estatísticas	59
4.4	EXPERIMENTO 3 – IMPACTOS DE MWCNT E NFC NAS MICROALGAS <i>CHLORELLA VULGARIS</i> E <i>KLEBSORMIDIUM FLACCIDUM</i>	59
4.4.1	Caracterização dos nanomateriais	59
4.4.1.1	<i>Análise por difração de raio X (DRX)</i>	59
4.4.2	Dispersão dos nanomateriais em meio Bold's Basal (BB) e água do Rio Sena.....	60
4.4.3	Cultura de células de microalgas	60
4.4.4	Estudo da interação física dos nanomateriais com as microalgas	60
4.4.4.1	<i>Potencial Zeta (PZ).....</i>	60
4.4.4.2	<i>Microscopia de luz</i>	61
4.4.4.3	<i>Microscopia eletrônica de varredura e microscopia eletrônica de transmissão.....</i>	61

4.4.5	Viabilidade celular pelo método de exclusão do Azul de Tripán	62
4.4.6	Análise da eficiência fotossintética	62
4.4.7	Atividade de Superóxido Dismutase (SOD)	62
4.4.8	Bioluminescência de ATP	63
4.4.9	Análises estatísticas	63
4.5	EXPERIMENTO 4 – TRANSFECCÃO <i>IN VITRO</i> DE FIBROBLASTOS E EMBRIÕES BOVINOS UTILIZANDO MWCNT-COOH CONJUGADOS COM PLASMÍDEOS MARCADOS COM GFP (pGFP) ..	64
4.5.1	Obtenção do DNA exógeno	64
4.5.2	Transformação em <i>Escherichia coli</i>	64
4.5.3	Extração e purificação de DNA plasmidial	65
4.5.4	Determinação da concentração e grau de pureza do DNA	65
4.5.5	Digestão com enzimas de restrição.....	66
4.5.6	Formação dos complexos MWCNT-COOH:pGFPs e ensaio de retardo da mobilidade eletroforética	67
4.5.7	Transfecção dos fibroblastos	67
4.5.8	Transfecção dos embriões	69
4.5.9	Microscopia de fluorescência	69
4.5.10	Citometria de fluxo	69
4.5.11	Detecção de GFP por PCR em tempo real	70
4.5.12	Análises estatísticas	70
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
5.1	EXPERIMENTO 1 – AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA CITOTOXICIDADE DE NFC E MWCNT-COOH EM FIBROBLASTOS BOVINOS	71
5.1.1	Caracterização dos nanomateriais	71
5.1.1.1	<i>Microscopia eletrônica de transmissão</i>	71
5.1.1.2	<i>Análise termogravimétrica.....</i>	72
5.1.2	Análise de viabilidade celular por citometria de fluxo	73
5.1.3	Estudo da interação dos nanomateriais com os fibroblastos por microscopia de luz e citometria de fluxo	77
5.2	EXPERIMENTO 2 – EMBRIOTOXICIDADE DE NFC E MWCNT-COOH EM EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS <i>IN VITRO</i>	83
5.2.1	Efeito dos nanomateriais no desenvolvimento embrionário	83

5.2.2	Expressão gênica	84
5.2.3	Número total de células e índice apoptótico	89
5.3	EXPERIMENTO 3 – IMPACTOS DE MWCNT E NFC NAS MICROALGAS <i>CHLORELLA VULGARIS</i> E <i>KLEBSORMIDIUM FLACCIDUM</i>	93
5.3.1	Análise por difração de raio X	93
5.3.2	Potencial Zeta (PZ)	93
5.3.3	Proliferação e Viabilidade celular	97
5.3.4	Eficiência fotossintética	104
5.3.5	Atividade da enzima antioxidativa SOD	107
5.3.6	Níveis intracelulares de ATP	110
5.3.7	Microscopia eletrônica de varredura e de transmissão	113
5.4	EXPERIMENTO 4 – TRANSFECCÃO <i>IN VITRO</i> DE FIBROBLASTOS E EMBRIÕES BOVINOS UTILIZANDO MWCNT-COOH CONJUGADOS COM PLASMÍDEOS MARCADOS COM GFP	118
5.4.1	Ensaio de retardo da mobilidade eletroforética	118
5.4.2	Avaliação da transferência gênica em fibroblastos	120
5.4.2.1	<i>Microscopia de fluorescência e citometria de fluxo</i>	120
5.4.2.2	<i>PCR em tempo real para a identificação do gene GFP</i>	123
5.4.3	Avaliação da transferência gênica em embriões	124
5.4.3.1	<i>Microscopia de fluorescência</i>	124
5.4.3.2	<i>PCR em tempo real para a identificação do gene GFP</i>	126
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	129
	REFERÊNCIAS	130
	APÊNDICES	153
	APÊNDICE A - Artigo “ <i>Cytotoxicity and expression of genes involved in the cellular stress response and apoptosis in mammalian fibroblast exposed to cotton cellulose nanofibers</i> ” publicado na <i>Nanotechnology</i> – 2013.....	153
	APÊNDICE B – Artigo “ <i>Ecotoxicological effects of carbon nanotubes and cotton cellulose nanofibers in the green microalga <i>Chlorella vulgaris</i></i> ” submetido à <i>Algal Research</i>	161
	APÊNDICE C - Artigo “ <i>Efficient delivery of DNA into bovine</i> ”	

<i>preimplantation embryos by multiwalled carbon nanotubes</i> ” submetido à <i>Nature communications</i>	162
APÊNDICE D - Resumos Expandidos publicados em anais de congressos..	163
APÊNDICE E - Resumos publicados em anais de congressos.....	164

1 INTRODUÇÃO

A nanotecnologia é uma ciência multidisciplinar que tem o potencial de melhorar a vida humana por aprimorar produtos existentes e gerar novas estruturas utilizando dispositivos que possuem pelo menos uma de suas dimensões menores que 100 nm (GAJEWICZ et al., 2012). Essa é uma nova área da ciência e considerada a tecnologia chave do século 21 como promessa de revolução em todo o mundo. Quando as dimensões dos materiais tornam-se muito pequenas, como é o caso da escala “nano”, as propriedades físicas e químicas passam a ser diferentes das observadas no mesmo material quando comparado ao seu tamanho original (ARORA et al., 2012). Essas novas propriedades podem ter potencial emprego na indústria de cosméticos, farmacêutica, medicina, agronegócio, despoluição ambiental e outras (BHUNIA et al., 2012; BIDDLESTONE-THORPE et al., 2012).

Dentre os Nanomateriais (NMs) existentes destacam-se as Nanofibras de Celulose (NFC) e os Nanotubos de Carbono (NTC). As NFCs são NMs atrativos devido as suas propriedades de hidrofiliabilidade, flexibilidade, resistência mecânica, ampla capacidade de modificação química, caráter biodegradável e proveniente de fontes renováveis (KOLAKOVIC et al., 2011). Os NTCs possuem características interessantes como peso ultraleve, elevada resistência mecânica, condutividade elétrica e térmica e grande superfície de contato (BIANCO, KOSTARELOS e PRATO, 2005).

Por outro lado, a ampla produção e disseminação de nanoestruturas têm levado a eventos de contato com organismos vivos, em situações ainda não compreendidas. No que tange a saúde pública, existe a preocupação com a exposição ocupacional e de consumidores aos produtos contendo NMs (KELLY et al., 2008; RAY, YU e FU, 2009; LING et al., 2012). Com relação à ecotoxicidade, a liberação de NMs em diferentes compartimentos ambientais (água, solo e ar) pode resultar na sua maior biodisponibilidade e acúmulo ao longo das cadeias alimentares (OBERDORSTER, OBERDORSTER e OBERDORSTER, 2005a), causando impactos no ecossistema. Portanto, há um consenso que para o seguro desenvolvimento da nanotecnologia, é essencial a avaliação dos potenciais efeitos adversos dos NMs na saúde humana e ambiental. Até o momento, são escassos os conhecimentos dos efeitos das NFCs e dos NTCs, especialmente com relação aos nanotubos multicamadas (*Multi-wall carbon nanotubes* - MWNTs). Alguns estudos observaram toxicidade *in vitro* de NFCs em células pulmonares humanas (CLIFT et al., 2011) e genotoxicidade em células vegetais (LIMA et al., 2012). Em se tratando de NTCs, efeitos tóxicos foram observados em

fibroblastos murinos e células epiteliais humanas (KISIN et al., 2011; SARGENT et al., 2012; CANCINO et al., 2013). No âmbito da ecotoxicidade, alguns trabalhos investigaram o impacto de NTC em microalgas consideradas bioindicadores de qualidade ambiental (BLAISE et al., 2008; SCHWAB et al., 2011), porém para as NFCs não são conhecidos seus efeitos nesses modelos biológicos. Portanto, o conhecimento ainda é escasso sobre a ação desses NMs em modelos animais e no ambiente.

Dentre as diversas aplicações desses promissores NMs, ressalta-se a utilização de NTC como carreadores não virais de DNA na transfecção de células e embriões de mamíferos. Os métodos disponíveis para transfecção gênica em embriões possuem limitações, fato que estimula o desenvolvimento de novos métodos alternativos de carreamento de genes de interesse. Os NTCs apresentam afinidade por ácidos nucleicos, podendo assim representar uma nova alternativa de carreadores na transfecção gênica (CHEUNG et al., 2010; NEAGOE et al., 2012), beneficiando áreas como a terapia gênica, estudo de doenças humanas e produção de proteínas terapêuticas por animais transgênicos.

O objetivo deste estudo foi avaliar os potenciais efeitos tóxicos de NFCs e MWCNTs em diferentes modelos biológicos (microalgas, células e embriões de mamíferos) e a aplicação dos MWCNTs na transfecção gênica em células e embriões de mamíferos.

1.1 NANOTECNOLOGIA

1.1.1 Definição de nanotecnologia

O prefixo “nano” é derivado da palavra Grega para “anão” e significa um bilionésimo (10^{-9}) de um metro. O conceito inicial de nanotecnologia foi introduzido pelo físico Richard Feynman em 1959 (FEYNMAN, 1960) na palestra intitulada “há mais espaço lá embaixo”, em que ele sugeriu a manipulação dos átomos para a construção de novos materiais. Assim, a nanotecnologia consiste no desenho, produção e aplicação de materiais na escala nanométrica (Fig. 1) com o objetivo de produzir novos materiais nanoengenheirados para serem aplicados nas mais diversas áreas.

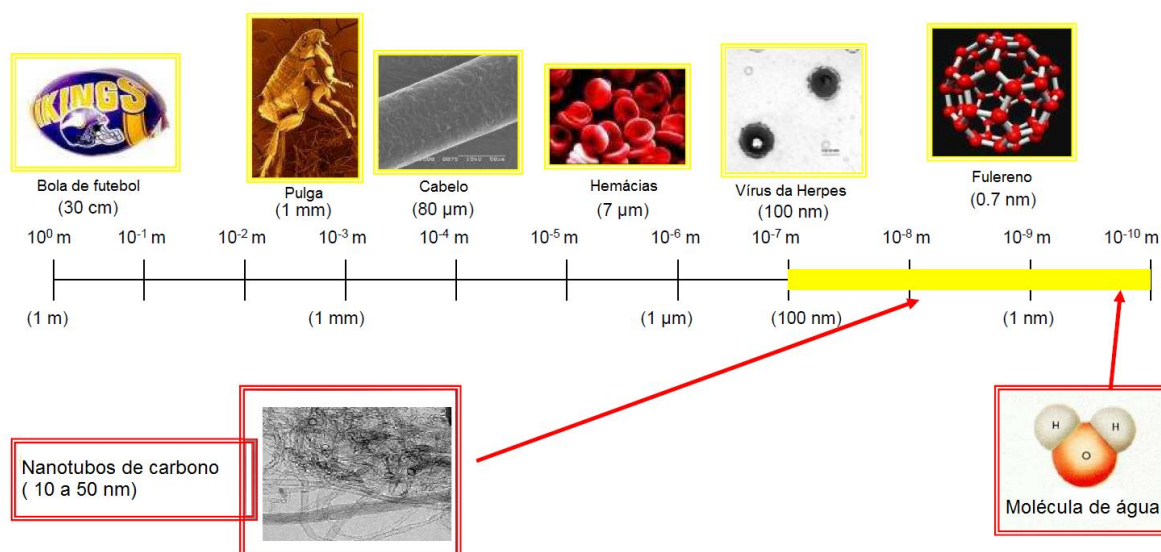


Figura 1. A escala nanométrica dos materiais. Fonte: Adaptado de NOHYNEK e DUFOUR (2008)

Os NMs são classificados pela norma *International Organization for Standardization* (ISO) como estruturas elementares que possuem pelo menos uma de suas dimensões entre 1 e 100 nm (ISO TS/27687, 2008). O número de dimensões destes elementos determina suas diferentes formas e propriedades: (a) três dimensões inferiores a 100 nm (nanopartículas); (b) duas dimensões inferiores a 100 nm (nanotubos e nanofibras); (c) uma dimensão inferior a 100 nm (nanofilmes) (BYSTRZEJEWSKA-PIOTROWSKA, GOLIMOWSKI e URBAN, 2009). Na Figura 2 são demonstradas algumas possíveis formas dos NMs.

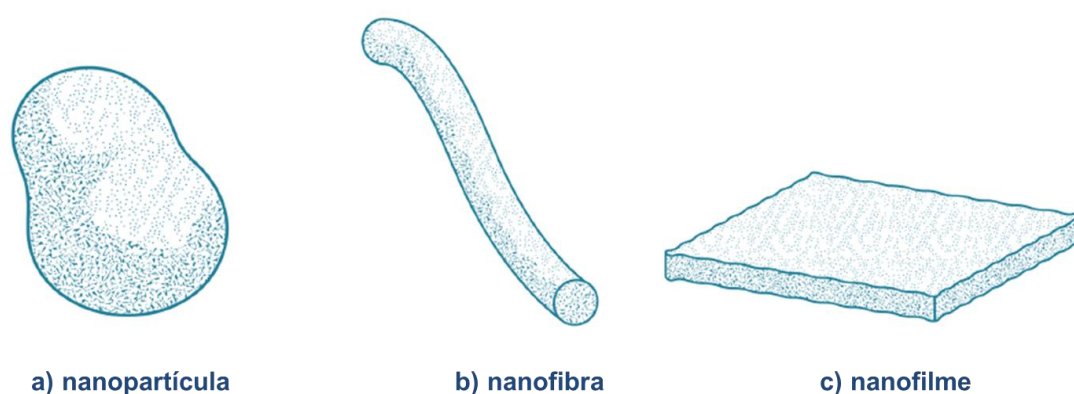


Figura 2. Diagrama esquemático demonstrando as principais formas dos nano-objetos. Fonte: Adaptado da norma ISO TS/27687 (2008).

Os NMs podem ter origem natural ou antropogênica, sendo que o primeiro grupo engloba, por exemplo, os produzidos e liberados nas queimadas e emissões vulcânicas, enquanto o segundo inclui os que são produzidos em consequência de atividades humanas,

tais como nos processos de refinação, soldadura, produção de alimentos ou combustão de automóveis (BUZEA, PACHECO e ROBBIE, 2007). Os NMs manufaturados são aqueles produzidos pelo homem de maneira intencional, com propriedades físico-químicas relacionadas à aplicação final do produto (HANDY, OWEN e VALSANI-JONES, 2008). Durante o processo de fabricação, o arranjo de átomos e moléculas dos NMs é modificado visando-se um produto final mais resistente, barato, leve, preciso e adequado. Os NMs mais pesquisados são os baseados em carbono (AHMED et al., 2009; CICCHETTI et al., 2011), em metais (BRAYNER et al., 2010) ou polímeros (AZEREDO et al., 2010; ABRAHAM et al., 2012). Esses NMs podem ser sintetizados por diversos métodos, porém, todos eles são divididos nos processos *top down* ou métodos de cima para baixo e *bottom-up* ou métodos de baixo para cima. No método *top down* as estruturas maiores são diminuídas continuamente de tamanho, até chegarem a dimensões nanométricas. Os métodos *bottom-up* utilizam vários processos químicos, físicos e conjugados para organizar os átomos e produzir os NMs particulados (CHEN et al., 2012).

O crescimento no uso da nanotecnologia é resultado da identificação de muitas propriedades únicas dos NMs tais como características magnéticas, catalíticas, óticas, elétricas e mecânicas (ARORA et al., 2012). Essas novas propriedades e fenômenos dos materiais na escala atômica e molecular podem ser controlados para novos usos que não eram possíveis com os mesmos materiais na sua escala original.

1.1.2 Iniciativas globais

A nanotecnologia é considerada uma das mais promissoras ciências desenvolvidas no século 21, uma vez que é capaz de oferecer soluções para vários problemas contemporâneos que não foram solucionados com tecnologias anteriores. Esta nova tecnologia permite o desenvolvimento de compostos e sistemas muito pequenos, mais rápidos e eficientes. A capacidade de manipular a matéria na escala “nano” promete desencadear uma série de inovações com novos materiais, cuja aplicação irá desde as indústrias têxteis, embalagens e alimentos, até para sofisticados procedimentos e tratamentos médicos. O interesse científico e comercial em nanotecnologia é evidenciado, por exemplo, por três prêmios Nobel concedidos (TOMONAGA, SCHWINGER e FEYNMAN, 1965; KROTO, 1996; GEIM e NOVOSELOV, 2010) e forte demanda do mercado global.

A grande expansão deste mercado nos últimos anos é retratada no banco de dados da *Woodrow Wilson, Nanotechnology Consumer Products Inventory* (<http://www.nanotechproject.org/inventories/consumer/>), onde foram identificados 1.317 produtos contendo NMs, produzidos por 587 empresas em 30 países no ano de 2012. Tanto os países desenvolvidos quanto os países emergentes, como o Brasil, vem investindo na promoção da nanociência e nanotecnologia com o objetivo de obterem uma posição de liderança nesta área. Esses esforços acarretam no rápido avanço das pesquisas, resultando em um grande número de patentes depositadas. De acordo com o projeto *Project on Emerging Technologies* os investimentos em pesquisa e desenvolvimento da nanotecnologia em nível mundial são de \$9 bilhões por ano. Em 2010, apenas os Estados Unidos investiram \$1.636 bilhões em pesquisa nessa área (DELGADO et al., 2010). Estima-se que em 2015 os produtos oriundos da nanotecnologia irão contribuir aproximadamente com \$1 trilhão de dólares para a economia global (RAY, YU e FU, 2009).

Devido à importância crescente do setor da nanotecnologia para os mercados globais, envolvendo áreas como a ciência dos materiais, engenharia de precisão, eletrônica e biomedicina, foi celebrado um acordo de cooperação científica e tecnológica entre a União Europeia e os Estados Unidos da América, e entre a União Europeia e a China. Por meio destes acordos, as organizações e empresas de investigação envolvidas poderão participar em projetos de pesquisas comuns. Atualmente, está em negociação um acordo entre a União Europeia e a Rússia para o desenvolvimento nanotecnológico (<http://ec.europa.eu/>).

No Brasil, a previsão de investimento é de R\$ 100 milhões até 2015 (dados do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação - MCT, <http://www.brasil.gov.br>). Dentro do MCT foi criado o Programa Nacional de Nanotecnologia no intuito de ordenar as ações nacionais nessa temática e apoiar a formação de redes de pesquisa, tais como a Rede Agronano, Nanobiotec, Renassomo, Renami, entre outras. Do ponto de vista governamental, foram fomentados fóruns de discussões envolvendo a academia e a indústria para trabalhar em marcos regulatórios. Em 2012, foi instituído o Sistema Nacional de Laboratórios em Nanotecnologias (SisNANO) formado por um conjunto de laboratórios dedicados às atividades de pesquisa, desenvolvimento e inovação (P,D&I), em um amplo espectro de nanotecnologias. O Governo Federal possui ainda acordos de cooperação em nanotecnologia com diversos países, entre eles Canadá, China, Estados Unidos, União Europeia, México e Argentina.

1.2 NANOFIBRAS DE CELULOSE

A celulose é o principal componente que reforça as paredes de células vegetais (HENRIKSSON et al., 2008). Essa macromolécula consiste numa cadeia linear de polissacarídeo formada por unidades monoméricas de β (1-4)-D-glicopirranose (Fig. 3A). As NFCs possuem 2 a 20 nm de diâmetro e poucos micrometros de comprimento e são também conhecidas como nanocristais, *whiskers* ou *nanowhiskers* de celulose (AZIZI SAMIR, ALLOIN e DUFRESNE, 2005; EICHHORN et al., 2010). Esses NMs podem ser obtidos de várias fontes, tais como algodão (TEIXEIRA et al., 2010), legumes (DUFRESNE, DUPEYRE e VIGNON, 2000), madeira (ABE, IWAMOTO e YANO, 2007), bactérias (MOREIRA et al., 2009), frutas (ZULUAGA et al., 2009) e tunicina (LEE et al., 2011).

O processo de obtenção mais utilizado é a hidrólise ácida (WANG et al., 2012). Para se obter suspensões coloidais de nanofibras, a celulose é submetida ao tratamento de branqueamento para a purificação e remoção de outros constituintes. Posteriormente, o material passa pelo tratamento com ácido para a remoção da fase amorfa e o material resultante é neutralizado e tratado com ultrassom. Esses NMs são semelhantes a “agulhas” e são considerados cristais sem defeito, seu tamanho e diâmetro vão depender da fonte da celulose.

As NFCs de algodão (Fig. 3B) são particularmente interessantes, visto que seu teor de celulose é superior em relação às fibras lignocelulósicas, o que evita o processo intermediário de branqueamento para remoção de outros constituintes não celulósicos (MOHANTYA, MISRA e HINRICHSEN, 2000).

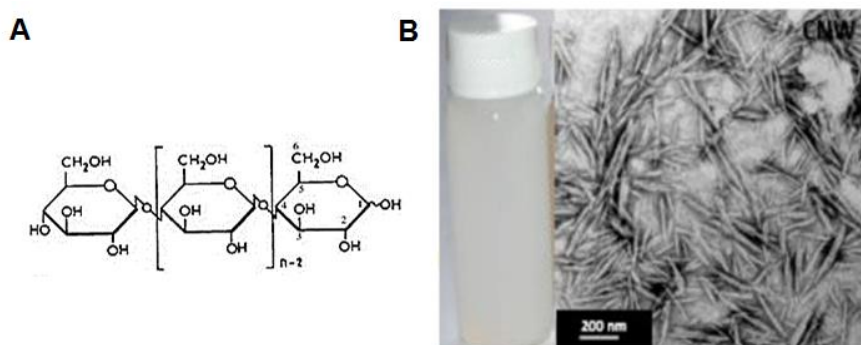


Figura 3. Estrutura de nanofibras de celulose (NFC) **A**. Unidades de celulose. **B**. Imagem de microscopia eletrônica de transmissão mostrando suspensões de NFC de algodão. Adaptado de Teixeira et al. (2010).

As NFCs apresentam propriedades mecânicas interessantes devido a sua organização estrutural, tais como flexibilidade, leveza, resistência, grande área de superfície e baixa densidade ($1,6 \text{ g cm}^{-3}$) (STURCOVA, DAVIES e EICHHORN, 2005; DUFRESNE, 2006; MOON et al., 2011). Esses NMs possuem grupos carboxilas em suas cadeias laterais, permitindo ligações de radicais num processo conhecido como funcionalização (XU et al., 2013). Outro aspecto atrativo do uso da celulose na escala “nano” é seu potencial caráter sustentável, uma vez que as nanofibras são obtidas a partir de fontes renováveis, biodegradáveis, de baixo custo (NISHINO, MATSUDA e HIRAO, 2004; ORTS et al., 2005) e abundantes em países emergentes como o Brasil.

Devido as suas características, as NFCs podem ser aplicadas em diversas áreas. Estudos apontam potencial uso na medicina para enxertos de peles artificiais, suportes de crescimento tecidual e na liberação controlada de fármacos (HENRIKSSON et al., 2008; LI et al., 2009). As NFCs também podem ter importante papel no processo de despoluição ambiental, como componente de membranas que possam atuar na filtragem de gases potencialmente tóxicos dispersos no ar (YOON, HSIAO e CHU, 2008), gerando benefícios diretos para o ambiente e à população. Outra área em expansão consiste na produção de filmes nanocompósitos comestíveis contendo esse NM (AZEREDO et al., 2010).

1.3 NANOTUBOS DE CARBONO

Em 1991, Sumio Iijima mostrou a existência de NTCs (IIJIMA, 1991), e, desde então, várias pesquisas têm sido realizadas, visto que estas nanoestruturas possuem inúmeras possibilidades de aplicações. Na Figura 4 estão representados os alótropos do carbono com estrutura cilíndrica formada por arranjos hexagonais deste átomo e de dimensões nanométricas, variando de 0,4 a 100,0 nm de diâmetro e na faixa de 0,2 a várias micras de comprimento (BARDI et al., 2009; CHEUNG et al., 2010).

Existem duas classes de NTCs: nanotubos de carbono de parede simples ou únicas (*Single-walled carbon nanotubes* - SWCNT), que são constituídos por apenas uma camada cilíndrica de grafite, e nanotubos de paredes múltiplas (*Multi-walled carbon nanotubes* - MWCNT; Fig. 5), que são constituídos de vários cilindros concêntricos de grafite. Os NTCs são mais comumente sintetizados por deposição química a vapor. Vapores contendo carbono, como os hidrocarbonetos (metano e etileno), são termicamente decompostos junto com um catalisador metálico (ferro, níquel ou cobalto) (KARTHIKEYAN et al., 2009). Esses

compostos são aquecidos até 900°C para que se decomponham. Os átomos de carbono provenientes do gás se agregam nas nanopartículas do metal dissolvido e crescem então a partir destas partículas. O ferroceno é um dos catalisadores mais utilizados. Posteriormente, há uma etapa de purificação para eliminar os resíduos dos catalisadores. Os NTCs são atrativos por possuírem peso ultraleve, elevada resistência mecânica, capilaridade, condutividade elétrica e térmica e grande superfície de contato (BIANCO, KOSTARELOS e PRATO, 2005). Particularmente, devido as suas propriedades de condução térmica, mecânica e elétrica, os NTCs podem proporcionar inúmeras melhorias nas estruturas dos materiais.

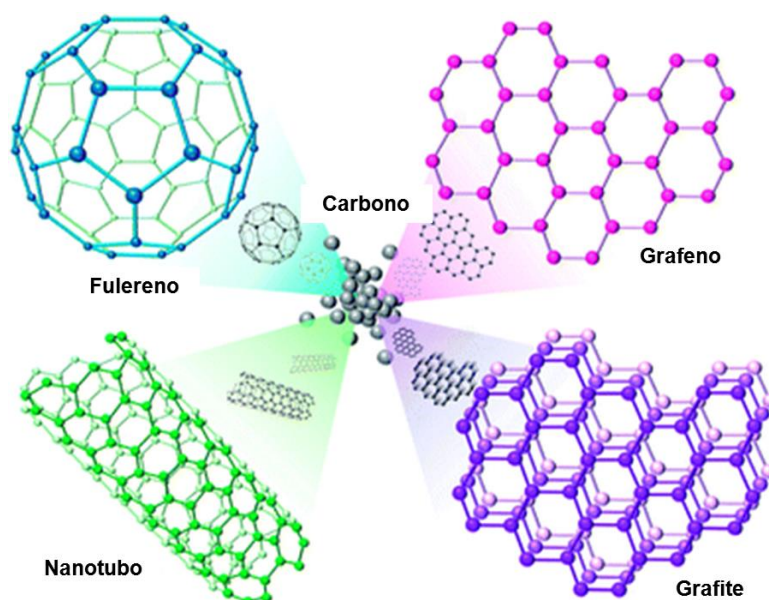


Figura 4. Alótropos de carbono em diferentes estruturas. Adaptado de Cheng (2013)

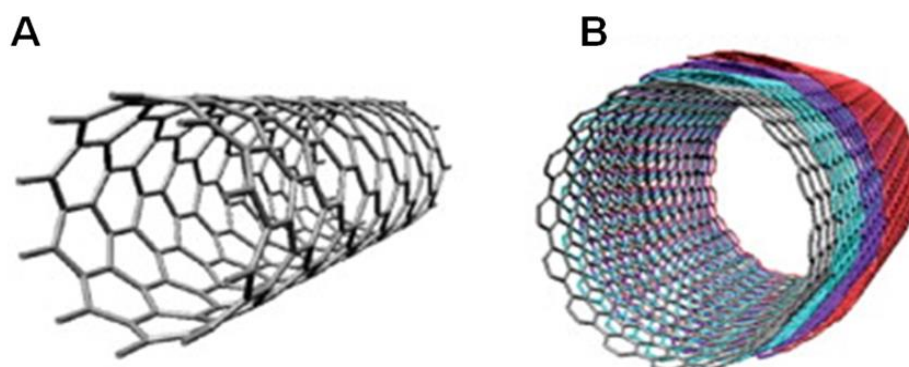


Figura 5. Esquema de nanotubos de carbono. **A.** Nanotubos de carbono de camada simples (SWCNT). **B.** Nanotubos de carbono multicamadas (MWCNT). Adaptado de Zhang et al. (2010).

As aplicações potenciais dos NTCs abrangem diversas áreas. Na agricultura, esses NMs têm sido utilizados na análise de pesticidas e incremento no crescimento de vegetais (FANG et al., 2009; KHODAKOVSKAYA et al., 2009). Na biomedicina, os NTCs podem produzir avanços importantes em diagnóstico, regeneração de tecidos, bioengenharia, biossensores e liberação controlada de fármacos (WAN e YING, 2010; YANG et al., 2010; TONELLI et al., 2012; GUPTA et al., 2013). Adicionalmente, podem atuar como carreadores de DNA, RNA e proteínas visando aplicação na terapia gênica (KAM, LIU e DAI, 2006; DELOGU et al., 2009; CHEUNG et al., 2010). Neste contexto, os estudos explorando a capacidade de *delivery* dos NTCs abrem novas possibilidades para a aplicação na transfecção de transgene de interesse na produção de animais geneticamente modificados.

O emprego dos NTCs em sistemas biomédicos possui algumas limitações relacionadas à sua acentuada hidrofobicidade, tendência de formarem agregados devido às interações de van der Waals entre os tubos, à dificuldade em controlar o seu tamanho, e a presença de impurezas decorrentes do processo de síntese (ZANGMEISTER et al., 2007; LEE e GECKELER, 2010). Para superar esses obstáculos, algumas estratégias vêm sendo exploradas para tornar esses NMs mais biocompatíveis. Uma alternativa é a funcionalização que consiste na adsorção de moléculas ou complexos moleculares na superfície dos NTCs para alterar suas propriedades físico-químicas (QI et al., 2003). A funcionalização facilita a interação dos NTCs com moléculas orgânicas, biológicas ou com outros grupos químicos, como fármacos ou DNA (SINNOTT et al., 2002; PANTAROTTO et al., 2004). Alguns trabalhos demonstraram que a funcionalização das paredes de SWCNT resultou em menor citotoxicidade a células cultivadas *in vitro* (DUMORTIER et al., 2006; SAYES et al., 2006). Assim, a funcionalização aumenta o potencial de aplicação dos NTC nas áreas biológicas e médicas.

Tratamentos químicos como a oxidação em fase líquida com ácido nítrico (HNO_3) adicionam grupos hidroxila (OH^-), carboxila ($-\text{COOH}$) e carbonila ($-\text{CO}$) à superfície dos NTCs que podem servir de âncora para a adição de outras moléculas (QI et al., 2003). Patlolla, Patlolla e Tchounwou (2009) e Jagadeesan e Eswaramoorthy (2010) observaram que a funcionalização torna os NTCs mais dispersos em água e facilita sua interação com oligonucleotídeos e proteínas. Outra observação importante é que a adsorção de DNA aos NTCs aumenta sua biocompatibilidade (O' CONNELL et al., 2001; BERHANU et al., 2009; CIOFANI et al., 2010).

1.4 POTENCIAL TÓXICO DOS NANOMATERIAIS

1.4.1 Nanotoxicidade

A nanotoxicologia é um novo ramo da toxicologia que surgiu para estudar os potenciais impactos adversos dos NMs em sistemas biológicos (ARORA et al., 2012; LOVE et al., 2012). O aumento da produção e uso de materiais nanométricos em diferentes segmentos tem causado preocupações sobre o potencial impacto desses produtos na saúde humana e no meio ambiente. Enquanto os benefícios da nanotecnologia têm sido amplamente publicados, as discussões sobre os potenciais efeitos deletérios sobre a saúde humana e ambiental estão em fase inicial de desenvolvimento (SHARMA, 2010). Neste contexto, a nanotoxicologia pode contribuir de maneira significativa para o desenvolvimento seguro e sustentável da nanotecnologia. Os estudos toxicológicos e ecotoxicológicos que estão sendo realizados buscam mensurar o impacto do efeito “nano” sobre os organismos. Para este fim, são abordados os parâmetros físico-químicos, rotas de exposição, biodistribuição, determinantes moleculares, genotoxicidade e aspectos regulatórios (ARORA et al., 2012). Adicionalmente, a nanotoxicologia envolve o desenvolvimento e validação de testes e protocolos confiáveis, robustos e seguros para avaliar potenciais riscos da produção e uso de NMs (DONALDSON e TRAN, 2004; LEWINSKI, COLVIN e DREZEK, 2008).

1.4.2 Propriedades físico-químicas de nanomateriais: efeitos biológicos

As propriedades físico-químicas dos NMs são atribuídas ao seu pequeno tamanho (área de superfície e distribuição de tamanho), composição química (pureza, cristalinidade, propriedades eletrônicas), estrutura de superfície (reatividade e grupos de superfície, revestimento inorgânico ou orgânico), solubilidade, forma, agregação e carga (OBERDORSTER, OBERDORSTER e OBERDORSTER, 2005a; ARORA et al., 2012). Na escala nanométrica existem forças e fenômenos que não ocorrem na macroescala. Com a redução das dimensões dos corpos, as forças de atrito, gravitacional e de combustão tornam-se de menor importância, por outro lado novas forças, como a eletrostática, van der Waals, browniano, mecânica quântica aumentam a sua intensidade (DHAWAN, SHARMA e PARMAR, 2009).

Alguns estudos sugerem que quanto menor o tamanho dos NMs maior são seus efeitos tóxicos (KAGAN, BAYIR e SHVEDOVA, 2005). Com isso, as propriedades que propiciam aplicações tecnológicas dos NMs também determinam seus possíveis efeitos adversos (NEL et al., 2006). O aumento na área de superfície determina o número potencial de grupos reativos na superfície da partícula.

Com a diminuição do tamanho das partículas a área de superfície aumenta exponencialmente e uma grande proporção de átomos ou moléculas torna-se potencialmente reativa. Essa grande reatividade dos NMs pode favorecer maior interação com componentes biológicos (SHARMA, 2010), incrementando as atividades que podem ser desejáveis (ação antioxidante, capacidade de carreamento de moléculas terapêuticas, penetração de barreiras celulares) ou causarem efeitos indesejáveis (toxicidade, indução de estresse oxidativo ou disfunção celular) (NEL et al., 2006).

A capacidade de aglomeração e dispersão também está vinculada ao tamanho dos NMs, que tendem a se unirem devido à ação das forças de Van der Waals (GRIEGER et al., 2010). O processo de agregação pode iniciar-se durante a síntese dos NMs, mas torna-se maior quando em contato com meios de cultura. Cargas presentes nessas soluções, como íons cálcio (Ca^{2+}) e proteínas do soro, podem favorecer ou impedir a aglomeração bem como influenciar a distribuição de tamanho dos agregados (SOHAEBUDDIN et al., 2010). Murdock et al. (2008) observaram que a aglomeração de NMs foi diminuída na presença de soro, devido à ação de proteínas que reduziram a atração das nanopartículas. Durante a aglomeração, o número de material particulado diminui enquanto a massa permanece inalterada, influenciando as respostas biológicas. Dhawan, Sharma e Parmar et al. (2009) relataram que NTCs dispersos foram menos citotóxicos quando comparados àqueles agregados. Estes mesmos autores sugerem alterações nas características estruturais durante a aglomeração.

Devido ao seu pequeno tamanho, os NMs são capazes de entrar no corpo humano por inalação, ingestão ou penetração cutânea. Uma vez dentro dos organismos esses materiais têm o potencial de interagir com estruturas intracelulares e macromoléculas por longos períodos (SHARIFI et al., 2012). NMs menores que 40 nm podem entrar no núcleo, enquanto que os inferiores a 35 nm podem, potencialmente, atravessar as barreiras de proteção como a hematoencefálica (OBERDORSTER et al., 2004; BORM et al., 2006).

Neste contexto, o contato de NMs com organismos podem causar efeitos biológicos adversos não observados pelo mesmo material na sua escala de tamanho natural (Fig. 6).

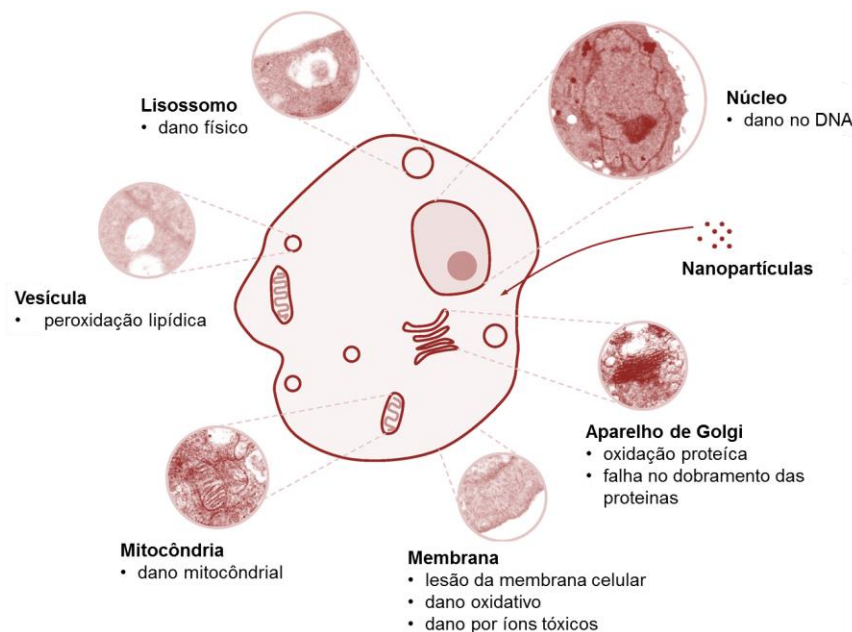


Figura 6. Interação de nanomateriais com as células: alvos intracelulares e mecanismos nanotoxicológicos. Adaptado de Elsaesser et al. (2012).

Os efeitos tóxicos conhecidos englobam lesões mecânicas ou peroxidação lipídica das membranas biológicas, danos a organelas intracelulares e lesões ao DNA (ELSAESSER et al., 2012). Estudos anteriores demonstraram que os NMs podem prejudicar o funcionamento das mitocôndrias (WILSON et al., 2002; HUSSAIN et al., 2005; PHENRAT et al., 2009), principalmente devido à perda de integridade da membrana mitocondrial (THIBODEAU et al., 2004), fato que geralmente leva a morte celular. Os NMs também podem prejudicar o ciclo celular e, conseqüentemente, a proliferação das células. Alguns estudos constataram que os MWCNTs induziram a parada do ciclo celular e apoptose em fibroblastos e linfócitos T (DING et al., 2005; BOTTINI et al., 2006).

Várias pesquisas vêm sendo desenvolvidas para melhor conhecimento dos mecanismos de interação e entrada de NMs em células, como a endocitose, a incorporação celular e a eficiência de transformação das partículas na via endocítica (NEL et al., 2006; AILLON et al., 2009), bem como a resposta fisiológica, distribuição e eliminação desses materiais (POWERS et al., 2007). A incorporação de NMs em sistemas vivos levanta várias indagações, pois, dependendo de suas características, eles podem se acumular dentro das células, órgãos e tecidos, causando efeitos deletérios imprevisíveis. No interior da célula, os NMs podem permanecer estruturalmente inalterados, serem modificados ou metabolizados (DUMORTIER et al., 2006; FISCHER e CHAN, 2007; SANVICENS e MARCO, 2008).

A interação de NMs e as células envolvem desde o contato com a membrana plasmática a adesão e penetração celular (SHI et al., 2011). No caso de NTCs, alguns estudos revelaram que estes NMs penetram nas células por endocitose ou passam livremente pela bicamada lipídica (AHMED et al., 2009; PACURARI et al., 2012). Com relação às NFC, Clift et al. (2011) observaram a presença desses NMs no interior das células pulmonares humanas, porém ainda não são conhecidos os mecanismos pelos quais essas nanofibras entram nas células.

Outro fator que determina a toxicidade dos NMs é a carga de superfície que exerce influência na adsorção de íons e biomoléculas, alterando as respostas celulares ou dos organismos expostos (SHARIFI et al., 2012). Adicionalmente, a carga de superfície é o maior determinante do comportamento coloidal, que pode influenciar as respostas biológicas de acordo com a mudança de tamanho ou forma dos NMs devido à formação de agregados ou aglomerados. Em geral, acredita-se que as superfícies catiônicas são mais tóxicas que as aniônicas por interagirem mais com os grupos fosfolipídios ou proteínas com cargas negativas presentes na membrana plasmática (PETKOVIC et al., 2011).

Os NMs podem apresentar diferentes formas tais como fibras, esferas e tubos. Grande parte do conhecimento sobre a toxicidade forma-dependente é oriunda de experimentos *in vitro*. Os efeitos *in vivo* são poucos conhecidos, mas alguns resultados demonstraram que a eficiência da fagocitose pelos macrófagos é influenciada pela forma dos NMs (VERMA e STELLACCI, 2010). Por exemplo, Champion e Mitragotri (2006) sugeriram que a endocitose é mais fácil e rápida se os NMs forem esféricos quando comparado a materiais em forma de tubos ou fibras.

Os NTCs e as NFCs são tubos e fibras que possuem uma forma semelhante a “agulha” (com diâmetro nanométrico e comprimento micrométrico). NMs com essa forma apresentam maior área de contato com os receptores da membrana celular que os NMs esféricos quando o eixo longitudinal interage com a superfície das células. Assim, a membrana dos macrófagos não consegue exceder a força máxima de polimerização da actina e esse esforço para tentar englobar NMs em forma de “agulha” pode causar uma distorção da membrana plasmática (LU et al., 2010; DOSHI e MITRAGOTRI, 2010). Pelo exposto, os NTCs e NFCs podem apresentar toxicidade semelhante a fibras de abestos devido à fagocitose parcial desses NMs (MAYNARD et al., 2004; DONALDSON et al., 2010; SHARIFI et al., 2012). Uma vez que a fagocitose completa é prejudicada e um fagossomo completo não é formado, os radicais livres e enzimas hidrolíticas são liberados no meio extracelular gerando respostas inflamatórias.

Outra consequência da fagocitose frustrada é a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) (POLAND et al., 2008). A geração desses radicais livres tem sido apontada como o principal mecanismo de lesão celular induzida por vários tipos de NMs que geralmente levam a morte celular (KIM et al., 2009; AHAMED, 2011; SHUKLA et al., 2011). Ainda, a exposição à NMs pode induzir a morte celular por meio da ativação de moléculas e proteínas relacionadas ao controle da apoptose. Por exemplo, Sohaebuddin et al. (2010) demonstraram que os MWCNTs estimularam a ativação de caspases em fibroblastos.

Por outro lado, alguns trabalhos evidenciaram que os NTCs podem ser inertes e não causam danos aparentes às células em meio de cultivo (DUMORTIER et al., 2006; YEHIA et al., 2007; BARDI et al., 2009; VITTORIO, RAFFA e CUSHIERI, 2009). A avaliação desses resultados, por vezes antagônicos, evidencia a necessidade de padronização dos protocolos de toxicidade e a determinação de parâmetros a serem utilizados nos ensaios, como a concentração e o tempo de exposição celular.

Com relação às NFCs, relatos científicos avaliando a sua toxicidade são numericamente escassos. Em células pulmonares humanas foi observada baixa toxicidade das NFCs (CLIFT et al., 2011), porém um trabalho posterior revelou efeitos genotóxicos desse NM em células vegetais (LIMA et al., 2012). Como as NFCs apresentam morfologia semelhante aos NTCs, elas potencialmente podem apresentar uma toxicidade morfológica dependente, o que reforça a necessidade de pesquisas de toxicidade desse novo material.

1.4.3 Rotas de exposição à nanomateriais e risco para a saúde pública

Os NMs estão sendo utilizados para fins comerciais na produção de semicondutores, cosméticos, microeletrônicos, catálise, filtragem de água, além de potencial uso na medicina e em outras áreas, levando a uma exposição humana direta ou indireta a esses materiais (NEL et al., 2006). De acordo com Som et al. (2010) a exposição humana aos NMs pode ocorrer durante as etapas de síntese e produção de produtos contendo nanotecnologia (exposição ocupacional) até à utilização desses mesmos produtos (exposição do consumidor) e a eliminação dos NMs e consequente acúmulo no ambiente que poderá constituir ainda uma fonte de exposição humana (exposição ambiental).

O corpo humano possui algumas interfaces de contato com substâncias presentes no ambiente como a pele, o trato gastrointestinal e o trato respiratório. A principal exposição da pele aos NMs pode ocorrer durante a aplicação intencional de cremes ou tratamentos com

medicamentos (BOLZINGER et al., 2012; MIHRANYAN, FERRAZ e STRØMME, 2012). Os NMs podem entrar em contato com os organismos humanos pelo trato gastrointestinal, após a limpeza mucociliar que ocorre no sistema respiratório ou pela ingestão direta desses materiais em alimentos, água, cosméticos e medicamentos (OBERDORSTER et al., 2005b; HAGENS et al., 2007).

A exposição aérea é considerada a mais significativa. Vários estudos epidemiológicos têm demonstrado que partículas ultrafinas estão associadas a doenças respiratórias e cardiovasculares, resultando em morbidade e mortalidade em determinadas parcelas suscetíveis da população (VON KLOT et al., 2002; WICHMANN et al., 2002; RYMAN-RASMUSSEN, RIVIERE e MONTEIRO-RIVIERE, 2006). Os NTCs e as NFCs possuem similaridades com partículas fibrosas como a forma e a baixa densidade específica. No caso dos NTCs, são adicionadas outras similaridades como a baixa solubilidade, o que pode conferir toxicidade similar à observada em fibras, como por exemplo, os asbestos (MAYNARD et al., 2004). Visando uma melhor compreensão de possíveis efeitos tóxicos dos NMs, patologias resultantes da inalação de NTCs têm sido objeto de pesquisas na área de medicina ocupacional e ambiental (TAKAGI et al., 2008; RAVICHANDRAN et al., 2011; HARALD et al., 2013).

Portanto, esforços necessitam ser direcionados para a pesquisa interdisciplinar voltada para as questões de toxicidade, epidemiologia, persistência e bioacumulação de NMs. Essas informações são de grande utilidade para a determinação de riscos para a saúde humana e ambiental e consequente controle e fiscalização da produção de itens contendo nanotecnologia (YANG et al., 2009).

1.4.4 Nanotecnologia e implicações ambientais

O desenvolvimento da indústria nanotecnológica é dependente de estudos na área de ecotoxicologia para garantir a segurança da produção e uso desses materiais (NEL et al., 2006). Os NMs que são liberados no ambiente interagem com o ar, o solo e a água podendo causar efeitos ainda desconhecidos. No ambiente aquático, o potencial tóxico dos NMs é dependente de fatores como a solubilidade, estabilidade, mobilidade das suspensões coloidais ou da tendência a agregação em grandes partículas, deposição e acúmulo nesse ambiente (NAVARRO et al., 2008). Baveye e Laba (2008) sugeriram que a agregação pode ter impactos na toxicidade, resultando em atividade biológica muito diferente daquela observada

nos materiais dispersos. Por exemplo, o aprisionamento de algas *Pseudokirchneriella subcapitata* em agregados de nanopartículas de dióxido de titânio (TiO₂) teve maior papel na toxicidade desse NM nessa espécie (ARUOJA et al., 2009). Como em sistemas aquáticos é esperada significativa sedimentação de agregados de NMs, os sedimentos devem ser considerados como importantes sumidouros desses materiais lançados no meio aquático (BAUN et al., 2008) e os organismos aquáticos como receptores chaves para os NMs. De fato, estudos com vários NMs em *Daphnia magna*, demonstraram uma toxicidade dose dependente desses materiais (ZHU et al., 2009).

1.4.5 Modelos de estudo de toxicidade

Não há dúvida de que a nanotecnologia oferece a perspectiva de grandes avanços que prometem melhorar a qualidade de vida e ajudar a preservar o meio ambiente. Entretanto, como qualquer área da tecnologia que faz uso intensivo de novos materiais e substâncias químicas, ela traz consigo alguns riscos ao meio ambiente e à saúde humana (QUINA, 2004). A crescente utilização de NMs, principalmente nas áreas biomédicas e no agronegócio, gera a necessidade de melhor entendimento dos mecanismos de interação dessas nanoestruturas com os sistemas biológicos. Nesse aspecto, estudos envolvendo a segurança química e biocompatibilidade são fundamentais para a utilização segura dos novos NMs (AHMED et al., 2009).

Modelos biológicos são comumente utilizados para determinar o potencial de novas substâncias e produtos de causarem danos à saúde humana e para outros organismos. Esses estudos podem ser realizados em modelos *in vivo* ou *in vitro*. Em especial, modelos *in vitro* fornecem um rápido e eficiente mecanismo para avaliar os NMs por numerosos parâmetros toxicológicos (ARORA et al., 2012) que podem fornecer informações para o estabelecimento das concentrações que causam alterações celulares. Algumas das vantagens na utilização de sistemas *in vitro* incluem: (1) estudo dos efeitos primários nas células alvo na ausência de efeitos secundários causados pela inflamação (efeito basal); (2) identificação de mecanismos primários de toxicidade na ausência de fatores fisiológicos e compensatórios que podem confundir a interpretação, como ocorre em modelos animais e (3) eficiência, rapidez e baixo custo (HUANG et al., 2010). A citotoxicidade basal consiste nos efeitos adversos resultantes da interferência na estrutura e/ou processos celulares essenciais para a sobrevivência, proliferação e/ou função comum a todas as células do organismo (EKWALL, 1995). Assim, a avaliação da

citotoxicidade *in vitro* é importante, uma vez que as funções celulares basais suportam as funções celulares órgãos-específicas. Outras vantagens são a redução da variabilidade entre os experimentos, menor uso da substância teste, gerando menos resíduos, e possibilidade de utilização de linhagens celulares transgênicas contendo genes humanos (TAKHAR e MAHANT, 2011). Ainda, ensaios de citotoxicidade basal *in vitro* foram propostos, validados e empregados como uma importante ferramenta na redução do número de animais utilizados na avaliação de toxicidade aguda sistêmica (VALADARES, 2006).

Os modelos experimentais desejáveis para os estudos de toxicidade e segurança no uso de NMs são aqueles de provável contato, como células do tecido epitelial ou organismos bioindicadores de toxicidade (DHAWAN, SHARMA e PARMAR, 2009). Outro aspecto a ser considerado no delineamento de estudos de toxicidade, principalmente de novos materiais potencialmente nocivos, é a utilização de diferentes modelos celulares. Isso ocorre, pois já foi demonstrado que a toxicidade dos NMs também pode ser influenciada pelos tipos de células e testes de toxicidade utilizados (WORLE-KNIRSCH, PULSKAMP e KRUG, 2006; MAGREZ et al., 2006). Alguns estudos revelaram que os NTCs podem induzir a apoptose em linfócitos e células renais humanas e em células epiteliais de camundongos (CUI et al., 2005; BOTTINI et al., 2006; RAVICHANDRAN et al., 2009), provavelmente por gerar EROs após serem introduzidos dentro das células (SCHRAND et al., 2007). Entretanto, Yehia et al. (2007) demonstraram que os NTCs não apresentaram efeitos tóxicos para células epiteliais humanas cultivadas *in vitro*. Adicionalmente, Bardi et al. (2009) e Vittorio, Raffa e Cushieri (2009) também não observaram alterações em neurônios de camundongos e neuroblastomas humanos expostos aos NTCs. Em um mesmo estudo, os MWCNTs apresentaram baixa toxicidade para células epiteliais, moderada toxicidade para fibroblastos e alta toxicidade para macrófagos (SOHAEBUDDIN et al., 2010). Portanto, a utilização de diferentes modelos biológicos é importante para a melhor compreensão sobre os possíveis efeitos adversos dos NMs que podem variar devido a vários fatores.

A interação de NMs com a pele tem recebido atenção, devido ao aumento do uso de partículas em nanoescala em roupas, cosméticos e protetores solares. A rota de exposição dermal também é importante devido à tendência de aglomeração dos NMs transportados pelo ar em superfícies que podem entrar em contato com o homem (SHINDE et al., 2012). Dentre as células utilizadas para esse fim, destacam-se os fibroblastos frequentemente empregados em estudos de nanotoxicidade (SOLMESKY et al., 2011; SABBIONI et al., 2012; BRUGÈ et

al., 2013; PERSSON et al., 2013). Essas células são importantes componentes do estroma que estão na matriz extracelular e tecidos de sustentação do corpo (SOHAEBUDDIN et al., 2010).

Embriões de animais de experimentação podem ser utilizados na avaliação dos potenciais efeitos teratogênicos após à exposição materna aos NMs. Nesse contexto, dados toxicológicos existentes sobre a interação de NTCs em mamíferos ainda são incipientes e foram obtidos em períodos mais tardios de desenvolvimento, o período fetal que ocorre após a implantação (LIM et al., 2011; PIETROIUSTI et al., 2011; ZALGEVIČIENĖ et al., 2012). Apenas um trabalho abordou a toxicidade de NTC em estágio inicial de desenvolvimento, porém foram utilizadas células embrionárias (ZHU et al., 2007) e não um embrião completo. Em NFCs, não são conhecidos seus efeitos em embriões ou fetos de mamíferos. Dentre os modelos embrionários mamíferos existentes, os bovinos são interessantes, pois podem ser produzidos *in vitro* em larga escala e possuem permissão ética, por serem provenientes de oócitos obtidos de ovários coletados em matadouro. Adicionalmente, embriões bovinos cultivados *in vitro* são sensíveis a alterações no ambiente, tais como temperatura, potencial hidrogeniônico (pH) e nutrientes (CAMARGO et al., 2006), o que possibilita avaliar a toxicidade de substâncias de interesse. Outro aspecto importante está relacionado a sua similaridade com os embriões humanos. Comparativamente aos embriões humanos, os bovinos apresentam o mesmo diâmetro e semelhanças metabólicas, de reprogramação genética e ativação genômica (BAUMANN et al., 2007; LEIDENFROST et al., 2011).

Adicionalmente, estudos envolvendo a determinação de concentrações possivelmente seguras de NTCs, que podem entrar em contato com embriões bovinos podem abrir novas possibilidades de produção de bovinos transgênicos. A produção de animais geneticamente modificados é de interesse para a medicina e indústria farmacêutica, pois podem ser utilizados, além de modelos para doenças, para a produção de proteínas humanas recombinantes e xenotransplante (SALAMONE et al., 2006).

No âmbito da saúde ambiental, as microalgas são representantes típicos de um dos grupos mais importantes da biocenose aquática, os produtores primários (BRAYNER et al., 2010), assim qualquer alteração na dinâmica de suas comunidades pode afetar os níveis tróficos superiores do ecossistema. As vantagens da utilização de microalgas em testes de ecotoxicidade incluem sua grande sensibilidade às alterações ocorridas no meio ambiente e o seu ciclo de vida relativamente curto, o que possibilita a observação de efeitos tóxicos em várias gerações (BLAISE et al., 2008; SCHWAB et al., 2011; CLEMENT et al., 2013). Os testes em microalgas é um dos importantes pilares da regulamentação em ecotoxicologia

(ARUOJA et al., 2009, SCHWAB et al., 2011), onde os dados são limitados. Dentre as microalgas utilizadas, destacam-se as verdes unicelulares de água doce *Chorella vulgaris* e filamentosas *Klebsormidium flaccidum* que crescem rapidamente e suas culturas são facilmente preparadas em laboratório (CLEUVERS e WEYERS, 2003).

1.5 APLICAÇÕES POTENCIAIS DOS NANOMATERIAIS

1.5.1 Eletrônica, energia e ambiente

Os novos NMs em desenvolvimento podem auxiliar no incremento da microeletrônica de ultra-alta compactação e miniaturização. Em especial, nas tecnologias de informação e computação, a nanotecnologia permitirá a manipulação de quantidades de informações extremamente grandes associadas a rápidas velocidades de processamento em sistemas cada vez menores (NAYDENOV e BOLAND, 2013).

Na área de energia, estudos apontam para a produção de células de combustível ou de sólidos nanoestruturados com potencial de armazenamento eficiente de hidrogênio ou células solares fotovoltaicas eficientes de baixo custo (SUN et al., 2012; HERR et al., 2013). Outra possibilidade é o uso de materiais nanoengenheirados que permitam um melhor isolamento e transporte em condutores elétricos resultando em uma iluminação mais eficiente.

Os benefícios para o ambiente vem desde a produção de energia de maneira sustentável (LIU et al., 2010a) até o desenvolvimento de sensores e biossensores a partir de NMs para monitorar a qualidade de água de fontes naturais e de resíduos das atividades industriais. Pode-se citar ainda a geração de membranas e robôs microscópicos que poderão remover substâncias nocivas do ar, água e solo (YOON, HSIAO e CHU, 2008; RAY, YU e FU, 2009), mitigando possíveis impactos ambientais.

1.5.2 Agronegócio

As aplicações da nanotecnologia no agronegócio contemplam toda a cadeia, incluindo as etapas desde a produção agrícola até o beneficiamento e desenvolvimento de produtos para o consumo. A nanotecnologia já vem sendo aplicada na melhoria da fertilidade do solo, na produção e melhoria de sementes, na fabricação de nanossensores destinados ao monitoramento da saúde animal, nas análises de solo com o intuito de reduzir o uso intensivo

de agrotóxicos (FANG et al., 2009; KHODAKOVSKAYA et al., 2009; NAIR et al., 2010). Outros setores que se destacam são a produção de filmes, revestimentos comestíveis e embalagens bactericidas para alimentos utilizando NMs (AZEREDO et al., 2010).

No Brasil, alguns dos resultados já obtidos englobam o desenvolvimento de revestimentos de biopolímero que aumentam o tempo de conservação de frutas e a “língua” eletrônica que possibilita a classificação do café com uma margem mínima de erro (SANTOS JUNIOR e CHAIN, 2009).

Outra aplicação potencial é a utilização da capacidade de entrega (*delivery*) dos NMs para o carregamento de ácidos nucleicos destinados à produção de animais transgênicos com características de interesse. Bovinos geneticamente modificados resistentes a doenças (mastite) ou produzindo leite enriquecido com proteínas já foram gerados (WALL et al., 2005; SALAMONE et al., 2006), porém em número limitado, principalmente pela baixa eficiência das metodologias disponíveis para gerar embriões geneticamente modificados. Portanto, a nanotecnologia pode representar uma alternativa para a produção de animais domésticos transgênicos.

1.5.3 Medicina e indústria farmacêutica

A nanomedicina consiste na aplicação da nanotecnologia na área da saúde para prevenir, diagnosticar ou tratar doenças. Esse novo ramo de pesquisa é um setor muito promissor e revolucionário que visa tratamentos médicos e terapias em diversas áreas. Os setores que recebem grandes esforços científicos são os de imagem, diagnósticos rápidos, terapêutica e regeneração tecidual (CHEN et al., 2012; DUNCAN et al., 2013). Os nanossistemas de imagem baseiam-se no uso de NMs, geralmente, semicondutores, metálicos ou magnéticos, como agentes de contraste para marcação *in vivo* (SANVICENS e MARCO, 2008). Estes novos estudos permitem aumentar a sensibilidade e a qualidade das imagens.

O nanodiagnóstico consiste na identificação de doenças em seus estágios iniciais em nível celular e molecular, mediante a utilização de nanodispositivos e sistemas de contraste (LIU et al., 2010b; BIDDLESTONE-THORPE et al., 2012). Essa identificação rápida propicia o estabelecimento de procedimentos adequados para um eficiente tratamento, oferecendo assim, maiores possibilidades de cura e recuperação do paciente. Recentemente, várias pesquisas têm sido conduzidas na produção de sistemas em escala “nano” para o uso

terapêutico de combate ao câncer (NEAGOE et al., 2012; DUNCAN et al., 2013; ZHANG, ZENG e LI, 2013).

A nanomedicina regenerativa visa à reparação de tecidos e órgãos acometidos por patologias ou danificados, mediante a associação de NMs com outras biotecnologias (por exemplo a terapia gênica, a terapia celular, a liberação de substâncias regenerativas e a engenharia de tecidos), estimulando os próprios mecanismos de reparação do corpo humano. As principais estratégias nanotecnológicas nessa área consistem na produção de novos materiais e sistema de suporte que estimulem a diferenciação e proliferação celular (WAN e YING, 2010; TONELLI et al., 2012). Em teoria, no futuro, micro robôs baseados em NMs poderão ser injetados dentro do organismo para combater doenças causadas por vírus ou bactérias, bem como remover células cancerosas (RAY, YU e FU, 2009).

Na indústria farmacêutica, os NMs podem ser utilizados para liberação controlada de fármacos, o que reduz tanto a quantidade, como os efeitos colaterais de determinados medicamentos (GAO, PANG e JIANG, 2013; ZHANG, ZENG e LI, 2013).

1.6 NANOTUBOS DE CARBONO COMO CARREADORES GÊNICOS

A introdução de genes exógenos nas células é uma etapa crucial para o estabelecimento da terapia gênica (SAKAI et al., 2006), estudo da regulação de expressão gênica e doenças humanas (WHEELER, WALTERS e CLARK, 2003; HOUEBINE, 2005) bem como na produção de proteínas terapêuticas por animais transgênicos (SALAMONE et al., 2006). As pesquisas que promovem o desenvolvimento ou o aperfeiçoamento dos sistemas de carregamento de material genético propiciam maior eficiência na modificação genética e produção de transgênicos. Em bovinos, a transgenia pode promover a melhoria da qualidade do leite, aumento da resistência a doenças e secreção de biofármacos pela glândula mamária (DONOVAN, KER e WALL, 2005; SABIKHI, 2007; ZHANG et al., 2008). Em adição, a geração de animais geneticamente modificados auxilia na criação de modelos para estudos de doenças (CUELLO et al., 2010). Contudo, a eficiência de produção de embriões transgênicos ainda é baixa, principalmente devido a falhas na transfecção e integração do transgene nas células embrionárias.

Vários métodos têm sido desenvolvidos para o estabelecimento de um eficiente sistema de carregamento gênico. Os sistemas existentes para células somáticas utilizam carreadores virais (SCHIRMER et al., 2007; MITTERMEYER et al., 2012) ou não virais que

incluem os métodos físicos ou químicos (KAMSTOCK et al., 2006; TOLEDO et al., 2009; GUO et al., 2012). A transfecção com carreadores virais têm apresentado bons resultados, devido a sua habilidade natural em penetrar nas células e assumir o controle da replicação, transcrição e tradução. Porém, estes carreadores possuem algumas limitações como a toxicidade, baixa capacidade de carga gênica, capacidade de causarem tumores, além da sua dificuldade de utilização em larga escala (LESAGE et al., 2002; MINTZER e SIMANEK, 2009; NUNES et al., 2010). Por outro lado, os métodos físicos e químicos que atuam na modificação da permeabilidade da membrana celular têm seu emprego limitado, principalmente, pela toxicidade (JOSHI e SCHOENBACH, 2002; RITTNER et al., 2002) além do DNA plasmidial ser geralmente degradado no citoplasma antes de chegar ao núcleo (CAI et al., 2005; WU et al., 2008).

Em embriões, uma das barreiras para se utilizar os métodos de transfecção tradicionalmente usados para células somáticas é a presença da zona pelúcida. Esta estrutura é formada por glicoproteínas e tem a função de proteger o oócito e o embrião contra infecções (JOVINE et al., 2005; GUPTA et al., 2009), impedindo uma provável perda da viabilidade embrionária. Desse modo, estratégias utilizando fusões entre membranas para a introdução de carreadores não atingem seu objetivo de carrear o material a ser transfectado para dentro dos embriões. Assim, os métodos de transfecção para produzirem animais transgênicos devem ser capazes de penetrar a zona pelúcida. As técnicas atualmente mais empregadas para este fim incluem a microinjeção de ácido desoxirribonucleico (DNA) dentro do pronúcleo (MOISYADI, KAMINSKI e YANAGIMACHI, 2009) e a transferência de DNA mediada por espermatozoide, também conhecida como injeção espermática intracitoplasmática (*Intracytoplasmic sperm injection* - ICSI), bem como a associação da transferência nuclear com células somáticas (TNCS) utilizando células somáticas geneticamente modificadas. Porém, estas técnicas apresentam baixas taxas em bovinos (POWELL et al., 2004; ROBL et al., 2007), além de serem laboriosas e exigirem equipamentos especializados.

Outra alternativa tem sido o uso de carreadores virais (HOFMANN et al., 2004), mas além dos potenciais efeitos adversos conhecidos para células somáticas, com essa metodologia há necessidade de remoção da zona pelúcida, o que aumenta a manipulação das estruturas e pode ocasionar a diminuição da viabilidade embrionária.

Pelo exposto acima, o desenvolvimento de métodos alternativos e eficientes de transfecção gênica, que superem as limitações citadas tanto para células somáticas quanto para embriões, é de suma importância para o aprimoramento da produção de animais

transgênicos. Mais recentemente, o uso da nanotecnologia em processo de transfecção gênica tem sido empregado em diferentes tipos celulares (CAI et al., 2005; SINGH et al., 2005; KAM, LIU e DAI, 2006; WU et al., 2008; AHMED et al., 2009; DELOGU et al., 2009; NUNES et al., 2010; NEAGOE et al., 2012). Essas pesquisas abriram novas possibilidades para a entrega eficiente de DNA exógeno em células somáticas ou embriões de bovinos.

Os NTCs possuem características desejáveis para serem utilizados como carreadores de DNA, tais como: grande superfície de contato, estabilidade e por interagirem com os ácidos nucleicos mediante interações hidrofóbicas, nas quais a fita de DNA enrola-se espontaneamente em torno dos NTCs (RAJENDRA et al., 2004; ENYASHIM, GEMMING e SEIFERT, 2007).

Gao e Kong (2004), utilizando simulação molecular observaram que moléculas de DNA podem ser encapsuladas dentro ou ao redor dos NTCs. As bases de nucleotídeos interagem com os NTCs ou com as proteínas por interações hidrofóbicas via *pi-stacking* (Fig. 7) que ocorrem entre anéis aromáticos ou via força de van der Waals enquanto os grupos fosfatos da molécula de DNA interagem com a água (ZHENG et al., 2003; GIGLIOTTI et al., 2006; VARDHARAJULA et al., 2012). Essa organização ocorre devido ao fato das moléculas de DNA serem anfipáticas, enquanto os NTCs apresentam características hidrofóbicas (LI, WU e LI, 2009).

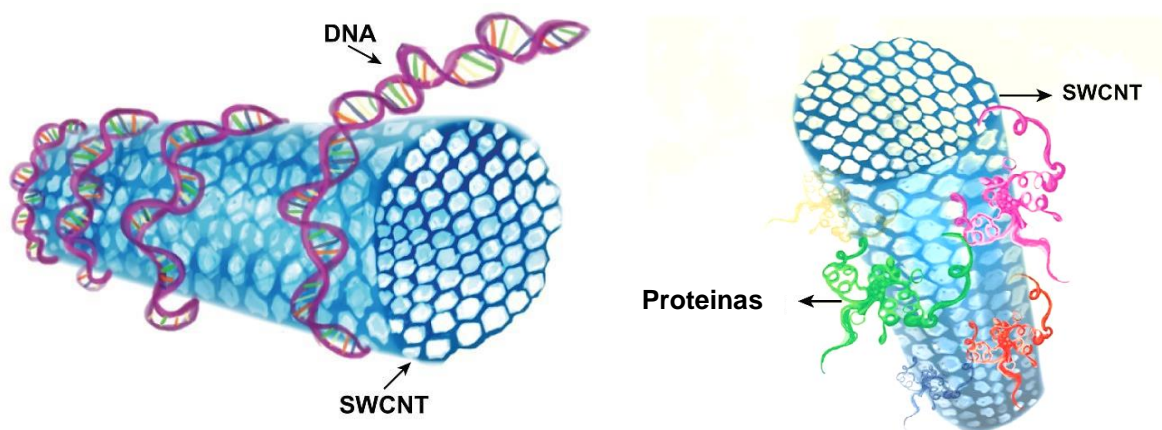


Figura 7. Interações entre NTC e DNA (esquerda) ou entre NTC e proteínas (direita). Adaptado de Vardharajula et al. (2012).

O processo de encapsulamento dos ácidos nucleicos dentro dos NTCs favorece sua proteção contra degradação por nucleases celulares (PATIL et al., 2008; WU et al., 2008; CHEUNG et al., 2010). Adicionalmente, a ligação não-covalente dos ácidos nucléicos na

superfície dos NTCs aumenta a eficiência da liberação do conteúdo quando este carreador encontra-se dentro da célula (LIU et al., 2005; SINGH et al., 2005; DELOGU et al., 2009). Entretanto, a eficiência da transfecção utilizando NTCs pode ser influenciada pelo tipo celular, tamanho e/ou pelo método de funcionalização dos NTCs (PANTAROTTO et al., 2004; AHMED et al., 2009; LIU et al., 2012).

Os NTCs podem ser construídos e acoplados a plasmídeos contendo o gene de interesse e um gene repórter (marcador). Posteriormente, em contato com os embriões, os complexos NTC:DNAs podem ser incorporados pelas células em divisão e, após sucessivas mitoses, o transgene tem o potencial de ser propagado para as células em desenvolvimento. Para monitorar a presença do transgene dentro das células, a maioria dos estudos utiliza um gene repórter que expressa a proteína verde fluorescente GFP (*green fluorescent protein*). Essa proteína emite fluorescência verde após ser excitada por meio de luz ultravioleta. Assim, a expressão da proteína GFP pode ser detectada, de forma direta, com o uso de microscopia de fluorescência (CHENG et al., 1997).

Estudos demonstraram que os NTCs penetram nas células somáticas por endocitose ou passam livremente pela bicamada lipídica (KAM, LIU e DAI, 2006; AHMED et al., 2009) e podem atingir o núcleo celular, aumentando a eficiência de transfecção (CAI et al., 2005). Contudo, em embriões não se sabe se os NTCs são capazes de passar pela zona pelúcida e atingir os blastômeros. Adicionalmente, não são conhecidos estudos que avaliaram a capacidade de NTCs carregarem material genético para o interior de embriões de mamíferos.

Neste contexto, a presente tese pretende avaliar os eventuais efeitos tóxicos de MWCNT e NFC em células de mamíferos e de microalgas, bem como uma nova aplicação biotecnológica de MWCNT na transferência de genes de interesse para fibroblastos e embriões de mamíferos.

2 HIPÓTESES

- O impacto da interação dos NMs (NFCs, MWCNTs não funcionalizados e MWCNTs funcionalizados com carboxila – MWCNT-COOH) com diferentes sistemas biológicos (microalgas, células e embriões de mamíferos) pode variar de acordo com a faixa de concentração e característica dos organismos estudados.
- Os MWCNT-COOHs podem ser utilizados como carreadores alternativos para a transfecção gênica em células e embriões de mamíferos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os potenciais efeitos tóxicos de NFCs, MWCNT não funcionalizados e MWCNT funcionalizados com carboxila (MWCNT-COOH) em diferentes modelos biológicos (células e embriões de mamíferos e microalgas), e a aplicação dos MWCNT-COOHs na transfecção gênica em células e embriões de mamíferos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Estudos de toxicidade

- Avaliar o potencial citotóxico de NFCs e MWCNT-COOH em fibroblastos bovinos cultivados *in vitro*.
- Analisar o potencial embriotóxico de NFCs e MWCNT-COOH em blastocistos bovinos produzidos *in vitro*.
- Examinar o potencial efeito ecotoxicológico de NFCs e MWCNT em microalgas cultivadas *in vitro*.

3.2.2 Ensaios de transfecção gênica

- Estudar a capacidade dos MWCNT-COOHs atuarem como carreadores na transfecção de plasmídeos marcados com GFP (proteína verde fluorescente) em fibroblastos e embriões bovinos cultivados *in vitro*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DENILEAMENTO EXPERIMENTAL

Nas Figuras 8 e 9 estão demonstrados os esquemas dos ensaios de toxicidade e transfecção gênica, respectivamente.

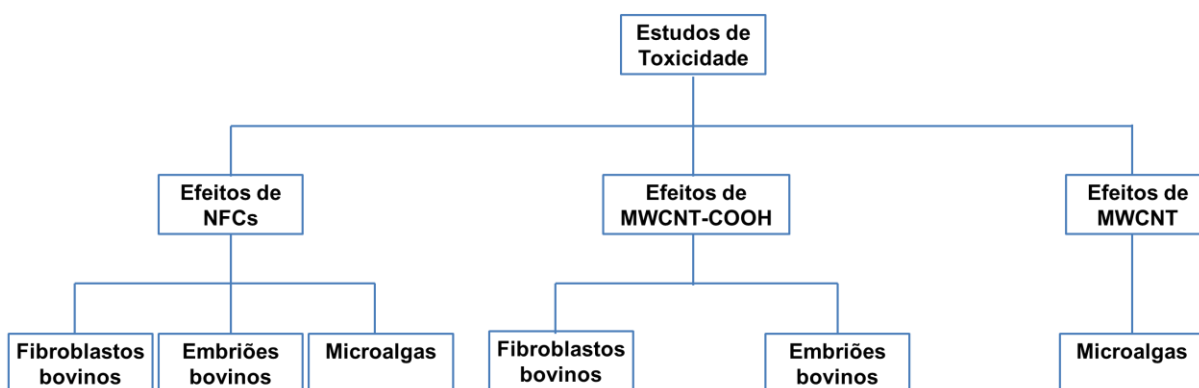


Figura 8. Desenho geral dos estudos de toxicidade *in vitro* de NFCs e MWCNTs em diferentes modelos biológicos: fibroblastos e embriões bovinos e microalgas de água doce (*Chlorella vulgaris* e *Klebsormidium flaccidum*).

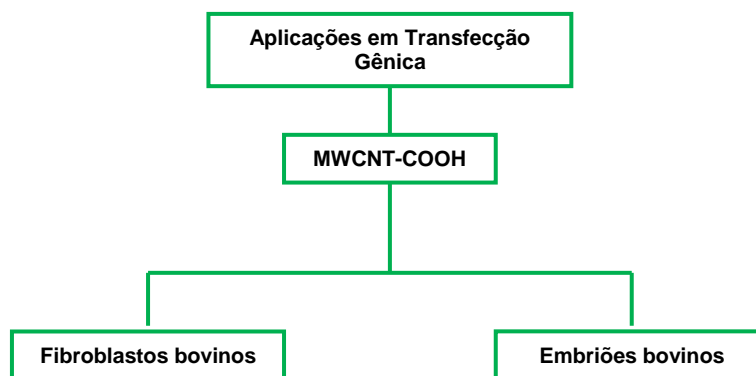


Figura 9. Desenho geral dos estudos de transfecção gênica utilizando MWCNT-COOH em fibroblastos e embriões bovinos.

Experimento 1:

- Foram analisados os efeitos da exposição de fibroblastos bovinos cultivados *in vitro* às NFCs e aos MWCNT-COOHs por meio de ensaios de citometria de fluxo que determinaram os efeitos da interação dos NMs na viabilidade e morfologia celular.

Experimento 2:

- Foram analisados os efeitos da interação de NFCs e MWCNT-COOHs com embriões produzidos *in vitro*. Para tanto, fez-se a análise de desenvolvimento embrionário, expressão gênica de biomarcadores de pluripotência embrionária (Histona deacetilase - HAD1 e *Octamero-binding transcription factor 4* - OCT4), estresse celular (*Heat shock protein 70.1* - HSP70.1 e Peroxiredoxina - PRDX1), controle da apoptose (*B cell leukemia 2 associated X protein* - BAX) e quantificação do número celular e apoptose *in situ*.

Experimento 3:

- Foram examinados os impactos de NFCs e MWCNTs não funcionalizados nas microalgas de água doce: *C. vulgaris* (unicelular) e *K. flaccidum* (filamentosa) por meio de ensaios de viabilidade celular, atividade fotossintética, estresse oxidativo, alterações no metabolismo energético e microscopia eletrônica de varredura e transmissão. Neste experimento foram utilizados MWCNT não funcionalizados para um melhor panorama do impacto deste material no ambiente, uma vez que a funcionalização aumenta a biocompatibilidade dos NMs.

Experimento 4:

- Foi estudada a capacidade de transfecção de MWCNT-COOH complexados a plasmídeos marcados com GFP (pGFP) em fibroblastos e embriões bovinos cultivados *in vitro* por microscopia de fluorescência e PCR.

Os experimentos 1, 2 e 4 foram realizados na Embrapa Gado de Leite, com apoio do laboratório Núcleo de Identificação e Quantificação Analítica (NIQUA) da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), laboratório de Nanomateriais do Departamento de Física (UFMG) e Laboratório Nacional de Nanotecnologia Aplicado ao Agronegócio (Embrapa São Carlos). O experimento 3 foi realizado no laboratório *Interfaces, Traitements, Organisation et Dynamique des Systèmes, Université de Paris Diderot 7* (ITODYs, Paris, França) durante

período sanduíche.

As NFCs foram produzidas no Laboratório Nacional de Nanotecnologia enquanto os MWCNT-COOHs e os MWCNTs no Laboratório de Nanomateriais da UFMG e gentilmente cedidos para a execução deste trabalho pelo Dr. Luiz Henrique Capparelli Mattoso e prof. Dr. Luiz Orlando Ladeira, respectivamente.

4.2 EXPERIMENTO 1 – AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA CITOTOXICIDADE DE NFC E MWCNT-COOH EM FIBROBLASTOS BOVINOS

4.2.1 Reagentes

Todos os reagentes utilizados são da Sigma Chemical Co. St Louis, MO, USA, salvo se especificado de outra forma.

4.2.2 Caracterização dos nanomateriais

4.2.2.1 *Microscopia eletrônica de transmissão (MET)*

Para as análises de MET, preparou-se uma solução diluída das NFCs e dos MWCNT-COOHs, uma gota desta suspensão foi colocada sobre suportes ultrafinos (*grides*) de cobre (400 mesh, Ted Pella - N° 01822) e deixada secar a temperatura ambiente. Transcorridas 24 h, as amostras foram coradas com solução 1,5% de acetato de uranila, por imersão dos *grides* por 2 min nesta solução de contraste.

As imagens foram obtidas em um equipamento Philips CM200. As dimensões (comprimento e diâmetro) foram calculadas com o programa *ImageJ* (versão 1.42e, dezembro de 2008).

4.2.2.2 *Análise Termogravimétrica e (TG) Termogravimétrica Derivada (DTG)*

As temperaturas de decomposição térmica das NFCs e dos MWCNT-COOHs foram avaliadas empregando-se a técnica de termogravimetria, utilizando-se um equipamento da TA Q500 (TA Instruments) nas seguintes condições: atmosfera de ar sintético; fluxo 60 ml/min; razão de aquecimento: 10 °C/min; intervalo de temperatura: 25 a 900 °C e porta amostra de

platina. A temperatura inicial de degradação térmica ou temperatura de “onset” foi determinada através da curva TG, como sendo a intersecção da linha de extrapolação do início do evento térmico com a tangente à curva gerada no intervalo da reação de decomposição das NFCs ou MWCNT-COOHs.

4.2.3 Dispersão dos nanomateriais em meio de cultura celular

As NFCs e os MWCNT-COOH foram esterilizados por autoclave durante 15 min. Após este período, foram preparadas soluções estoques dos NMs (5 mg ml^{-1}) em meio de cultura celular *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM; Nutricell, Campinas, SP, Brasil), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB; Nutricell) com auxílio de ultrassom por 2 min, para a completa dispersão dos NMs.

4.2.4 Cultura de células de fibroblastos

Os fibroblastos utilizados no experimento foram obtidos a partir de um banco de células criopreservadas em meio DMEM a 20% SFB e 10% de dimetil sulfóxido (DMSO), mantidas em nitrogênio (N_2) líquido. Os fibroblastos da linhagem 3447 pertenciam a um banco de células da Embrapa Gado de Leite, gerado a partir de uma pequena porção de tecido extraída da orelha de uma vaca Gir, localizada no Campo Experimental José Henrique Bruschi (Embrapa Gado de Leite). Todas as células estavam em 2ª passagem no momento do congelamento.

Após o descongelamento, os fibroblastos (3ª passagem) foram cultivados em placas de 4 poços (Corning) na densidade de 1×10^4 células/poço em meio DMEM, acrescido de 10% de SFB e 1% antibióticos ($10.000 \text{ units ml}^{-1}$ penicilina e $10.000 \mu\text{g ml}^{-1}$ estreptomicina). O cultivo foi realizado em estufa incubadora (6100, Napco, Canadá) a 37°C , 5% de CO_2 em ar atmosférico e 95% de umidade.

4.2.5 Exposição dos fibroblastos aos nanomateriais

Para a determinação da concentração letal mediana (CL50) das NFCs ou MWCNT-COOHs, isto é, a concentração de NMs que causa a mortalidade em 50% das células *in vitro*, os fibroblastos (70% de confluência) foram expostos as diferentes concentrações desses

materiais por 24h. Para os MWCNTs foram estudadas as seguintes concentrações: 0,20; 0,50; 1,00; 100; 200 e 400 μgml^{-1} e no caso das NFCs, foram necessárias maiores concentrações para a determinação da CL50: 0,20; 0,50; 1,00; 100; 200, 400, 800, 1000, 2000 e 3000 $\mu\text{g ml}^{-1}$. As células foram mantidas em contato com os NMs em estufa incubadora a 37° C, 5% de CO₂ em ar atmosférico e 95% de umidade.

Os testes de citotoxicidade *in vitro* foram baseados na norma ISO 10993-5 (2009) e em trabalhos anteriores, nos quais 24 h demonstrou ser um tempo de exposição adequado para avaliação dos efeitos de NMs na sobrevivência celular (SAYES et al., 2006; PARK et al., 2008; SOHAEBUDDIN et al., 2010).

4.2.6 Avaliação da viabilidade e morfologia celular por citometria de fluxo

O efeito da adição de NFCs e MWCNT-COOHs no meio de cultura contendo fibroblastos bovinos foi avaliado por citometria de fluxo, utilizando-se o fluoróforo Iodeto de Propídeo (IP) como marcador de viabilidade. O IP possui a capacidade de penetrar apenas nas células com a membrana plasmática danificada, o que implica na presença de células em processo de morte celular.

Após exposição de 24 h às NFCs e aos MWCNT-COOH os fibroblastos foram lavados três vezes em tampão fosfato-salino (PBS; 0,1M; pH 7,4; Nutricell) e tratados com tripsina 0,1% e tris borato etilenodiamino tetra-acético (EDTA) a 0,05% por 3 a 5 min para desprenderem do fundo da placa. Em seguida, a tripsina foi inativada com DMEM acrescido de 10% SFB. A suspensão celular foi centrifugada a 18 rotação por minuto (rpm) (BE-6000, Bioeng) por 5 min. Posteriormente, foram adicionados 300 μl de IP ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$) em PBS ao meio e os fibroblastos foram mantidos a 37° C por 30 min.

Após esse período, foi realizada a leitura das células no citômetro de fluxo (FACS Calibur; Becton Dickinson, San Jose, CA). Com a excitação do laser de 488 nm, as células marcadas com IP emitiram fluorescência a 617 nm que foi captada pelo filtro FL2 (fluorescência laranja-avermelhada – 585/42 nm) do citômetro de fluxo. Foram adquiridos 10.000 eventos por amostra em triplicata e os dados analisados no *Windows Multiple Document Interface for Flow Cytometry* (WinMDI 2.9, Joseph Trotter).

4.2.7 Avaliação por microscopia de luz

O crescimento e a morfologia celular foram observados utilizando-se um microscópio de luz invertido (ICM 405, Zeiss, Alemanha).

4.2.8 Análises estatísticas

Os resultados da viabilidade celular foram avaliados por análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de *Student Newman Keus* (SNK) com auxílio do pacote estatístico SAS (*Statistical Analysis System*), em sua versão 9.0. Os valores de P menores que 0,05 foram considerados significativos. Os resultados foram apresentados como médias \pm erro padrão (EP) da média. Os gráficos foram gerados no programa SigmaPlot 2002[®] para Windows versão 8.0 (SPSS Inc., 2002).

4.3 EXPERIMENTO 2 - EMBRIOTOXICIDADE DE NFC E MWCNT-COOH EM EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO*

4.3.1 Dispersão dos nanomateriais em meio de cultivo embrionário

As NFCs e os MWCNT-COOHs foram dispersos em meio de cultivo embrionário *Charles Rosenkran's 2 amino acid* (CR2aa) suplementado com 10% SFB com auxílio do ultrassom (2 min), produzindo uma solução estoque (0,5 mg ml⁻¹)

4.3.2 Produção *in vitro* de embriões

4.3.2.1 Maturação *in vitro* (MIV)

Ovários de vacas predominantemente mestiças (Holandês-Gir) oriundos de rebanhos de gado de leite da região de Juiz de Fora, foram coletados no matadouro local para a obtenção dos oócitos imaturos. Os ovários foram obtidos logo após o abate e transportados para o laboratório em solução fisiológica, acrescida de penicilina e estreptomicina à temperatura de 35° C para a aspiração de oócitos imaturos e MIV. Foram aspirados folículos visíveis com diâmetro de 2 a 8 mm.

Os oócitos foram distribuídos aleatoriamente em poços de placas tipo *Nunc* com 400 µl de meio *Tissue culture medium* 199 (TCM 199), suplementado com 2 µg ml⁻¹ de hormônio folículo estimulante (FSH; Pluset, Barcelona, Espanha) e soro de vaca em cio (10%) e mantidos em incubadora com 5% de CO₂, ar atmosférico e 38,5° C, por 24 h.

4.3.2.2 Fecundação *in vitro* (FIV)

Após 24 h de MIV, os oócitos foram fecundados *in vitro* com sêmen descongelado de touro da raça Gir. O sêmen utilizado foi testado previamente no laboratório quanto à capacidade de desenvolvimento de embriões de FIV, de modo que, utilizou-se a mesma partida de sêmen durante todo o experimento. Para a seleção dos espermatozoides foi usado o método do gradiente de Percoll (Nutricell) com as concentrações de 45% e 90% (PARRISH, KROGENAES e SUSKO-PARRISH, 1995).

A FIV foi realizada em gotas de 100 µl de meio Fert-Talp, acrescido de 10 UI ml⁻¹ de heparina. As gotas continham uma concentração espermática de 2,0 x 10⁶ espermatozoides ml⁻¹, e foram cobertas com óleo mineral e mantidas por período aproximado de 22 h em estufa incubadora com 5% de CO₂, umidade de 95%, a 38,5 °C.

4.3.2.3 Cultivo *in vitro* (CIV) e exposição aos nanomateriais

Após a fecundação, os possíveis zigotos foram transferidos para meio de cultivo embrionário CR2aa suplementado com 10% de soro fetal bovino, e mantidos em incubadora com 5% de CO₂, umidade de 95% a 38,5 °C, por 7 dias. Após a visualização e avaliação dos blastocitos com o auxílio de estereomicroscópio (Olympus, SZ40, Washington, EUA), eles foram divididos em 3 grupos: controle, expostos a 0,2 µg ml⁻¹ de NFC ou MWCNT-COOH por 72 h. Essa concentração de NMs foi escolhida por não ter causado citotoxicidade em fibroblastos bovinos cultivados *in vitro*.

4.3.3 Avaliação da taxa de eclosão e degeneração

Os blastocistos permaneceram em contato com os NMs por 72 h em incubadora com 5% de CO₂, umidade de 95%, a 38,5 °C. Ao final deste período, foi feita nova análise para avaliar a taxa de eclosão e degeneração embrionária.

4.3.4 Expressão gênica por reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real

Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) para os genes HAD1, OCT4, HSP70.1, BAX e β -ACTINA foram desenhados a partir de sequências disponíveis no banco de dados do *GenBank* (www.ncbi.nlm.nih.gov), utilizando-se o programa Primer3 (ROZEN e SKALETSKY, 2000).

O *primer* para PRDX1 foi produzido de acordo com Mourot et al. (2006). Todos os *primers* foram sintetizados pela *Integrated DNA Technologies* (Coralville, IA, EUA) e estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 – Sequência dos *primers* específicos, temperaturas de pareamento, tamanho dos produtos e fonte de acesso às sequências no *GenBank*

Produto	Sequência do <i>primer</i>	Temperatura de pareamento	Tamanho do produto (pb)	Nº de acesso no GenBank/Referência
PRDX1	F 5'TGCCAGATGGTCAGTTCAAG3' R 5'CCTTGTTTCTTGGGTGTGTTG3'	53° C	224	Mourot et al. (2006)
BAX	F 5'TTGCTTCAGGGTTTCATCCAGGA3' R 5'CAGCTGCGATCATCCTCTGCAG3'	64° C	174	NM_173894
HSP70.1	F 5' ACAAGATCACCATCACCAACG3' R 5' TCCTTCTCCGCCAAGGTGTTG3'	59° C	275	NM_174550
HAD1	F 5' GCGGGCGCAAGAACTCTTCCAA3' R 5' AGAGTTTGGGAGGGACGGGTTG3'	57° C	372	NM_001037444.1
OCT4	F 5' CCCACCCTGCAGCAAATTA3' R 5' GCTTGATCGTTTGCCCTTCT3'	50° C	105	NM_174580.2
β -ACTINA (endógeno)	F 5'GACATCCGCAAGGACCTCTA3 R 5'ACATCTGCTGGAAGGTGGAC3'	53° C	205	NM_173979

4.3.4.1 Extração de RNA e síntese de DNA complementar (cDNA)

A extração do RNA foi realizada em três pools de 10 embriões para cada grupo utilizando-se o kit comercial *RNeasy Micro kit* (Qiagen, Hilden, Alemanha). A lise celular foi feita com auxílio do tampão RLT® acrescido de 10% de β -mercaptoetanol (β -ME; Gibco Brl Life Technologies, Nova York, EUA). O lisado foi homogeneizado, acrescido de solução etanólica a 70% e transferido para uma coluna de obtenção do RNA. Para a lavagem foi adicionado tampão RW1® e, posteriormente, foi realizada a incubação com 10 μ l de DNase por 15 min. Após este período, ocorreu novamente a lavagem com o tampão RW1® e com o tampão RPE®. Em seguida, foi feita a adição de solução etanólica a 80% à coluna e a

membrana, onde o RNA fica aderido. Em seguida, foi realizada centrifugação por 5 min em temperatura ambiente para secar a membrana. Para eluição, foram utilizados 12 µl de água livre de RNase, gerando um volume final de aproximadamente 11 µl (55 ng) de RNA por reação.

A transcrição reversa foi obtida com o auxílio do kit comercial *SuperScript III First-Strand Synthesis Supermix* (Invitrogen, Califórnia, EUA). Foram utilizados 6 µl (30 ng) de RNA em cada reação de síntese de cDNA. Uma reação contendo RNA, *primer* oligo dT, tampão de pareamento e água livre de RNase/DNase foi realizada, incubando-se estes reagentes por 5 min a 65° C. Em seguida, 12 µl de um *mix* (*2X First-Strand reaction mix* e *SuperScript III RNaseOUT Enzyme mix*) foram adicionados à reação e esta foi incubada a 50°C por 50 min, seguido de 85°C por 5 min. O volume final foi de 20 µl (14.000 ng) de cDNA por reação.

Após a extração e transcrição reversa, 1 µl do RNA e cDNA de cada amostra foram avaliados em espectrofotômetro (Nanodrop ND-1000, Wilmington, EUA) para análise da concentração e pureza do material. O cDNA de cada grupo experimental permaneceu estocado em freezer à temperatura de -80°C, até posterior utilização.

4.3.4.2 PCR em tempo real

As reações de PCR em tempo real foram feitas com o kit comercial *Power SYBR® Green PCR Master Mix* (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, EUA). A reação contendo cDNA, par de *primers*, *Master Mix* (dNTPs, referência passiva-ROX, *SYBER Green*) e 0,1 U de Taq DNA Polimerase, em um volume final de 25 µl, foi incubada a 95° C por 10 min, seguido de 45 ciclos de 95° C por 15 seg, temperatura de pareamento específica para cada *primer* (Tabela 1) por 30 seg e extensão a 60° C por 30 seg. Controles negativos foram preparados em que o cDNA foi omitido durante a reação. Foram feitas reações, em triplicata para cada amostra (de todos os grupos) das respectivas repetições, em placas ópticas de reação de 96 poços (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA), seladas com filme adesivo óptico e amplificadas no aparelho de PCR em tempo real (*ABI Prism 7300Sequence Detection Systems*, *Applied Biosystems*).

A eficiência de cada reação foi calculada utilizando o *software LinRegPCR* (RAMAKERS et al., 2003). Os valores logarítmicos de fluorescência em cada ciclo foram utilizados para obtenção da inclinação da reta, calculada a partir de regressão linear simples, e

para o cálculo do coeficiente de correlação de Pearson. Na análise de cada reação, somente os pontos com coeficiente de correlação entre 0,999 e 1 foram utilizados para o cálculo da eficiência. Desta forma, foi possível obter a eficiência de cada reação individualmente. A quantificação relativa foi realizada utilizando-se o método do *Cycle Threshold* (CT) comparativo, com os resultados expressos em relação ao gene de referência endógena e um grupo calibrador (grupo controle). As análises da quantificação relativa dos genes foram realizadas com o *Relative Expression Software Tool* (REST®) (PFAFFL, HORGAN e DEMPFLER, 2002), que possui o modelo estatístico *Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation TEST*® (versão 384 - Beta, 2005).

4.3.5 Índice apoptótico embrionário (TUNEL)

A fragmentação do DNA foi avaliada como indicador de apoptose em células embrionárias. Para tanto, utilizou-se o Kit comercial *Dead end fluorimetric terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end (TUNEL) System* (Promega, Madison, WI, EUA). Os blastocistos expostos às NFCs e aos MWCNT-COOHs foram lavados em gotas de 100 µl de PBS acrescida de 0,1% de albumina sérica bovina (*bovine serum albumin* – BSA), fixados em formaldeído 4%, lavados novamente e armazenados em criotubos com PBS a 4° C.

Para a confecção das lâminas, os embriões foram inicialmente permeabilizados por imersão em solução de 0,2% de Triton X-100 em solução salina fosfatada, e incubados em gotas de tampão de equilíbrio, *mix* de nucleotídeos, enzima *recombinant terminal deoxynucleotidyl transferase* (rTdT) e corante de fluoresceína-12– desoxiuridina-5'-trifosfato (dUTP), que cora o DNA fragmentado. Os embriões permaneceram nesta condição a 37° C por 1 h em câmara úmida coberta com papel alumínio. No controle negativo, os embriões foram incubados com tampão de equilíbrio sem enzima rTdT. No controle positivo, os embriões foram incubados com tampão de equilíbrio, enzima DNase (para promover a degradação do DNA nas células do embrião) e a enzima fluoresceína-12-dUTP. Passada esta etapa, os embriões foram transferidos para lâmina, corados com 4'6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) em Vectashield (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, EUA), um corante de fluorescência, e recobertos com lamínula.

Todos os blastômeros embrionários foram marcados pelo DAPI e visualizados em azul no filtro de 460 nm do microscópio de epifluorescência (BX 52, Olympus, Washington,

EUA). As células embrionárias em apoptose foram identificadas no filtro de 520 ± 20 nm, apresentando-se a cor verde pela absorção da fluoresceína. As lâminas foram observadas em microscópio de epifluorescência e as imagens foram capturadas utilizando-se o programa Image-Pro Plus 4.5 (Media Cybernetics, Silver Spring, EUA).

Posteriormente, o número total de células e o número de células apoptóticas foram analisados utilizando-se o programa *Image J*. O índice apoptótico foi calculado a partir da relação do número total de células e o número de células contendo corpos apoptóticos.

4.3.6 Análises estatísticas

Para a análise estatística das taxas de eclosão e degeneração foi utilizado o teste de Qui quadrado. O número total de células embrionárias, número de células apoptóticas e índice apoptótico foram avaliados por ANOVA e as diferenças entre médias foram comparadas pelo teste de SNK, com auxílio do programa estatístico SAS 9. Os dados obtidos da quantificação relativa da PCR em tempo real foram analisados pelo *Relative Expression Software Tool* (REST®). Os valores de P menores que 0,05 foram considerados significativos. Os resultados foram apresentados como médias \pm EP da média. Os gráficos foram gerados no programa SigmaPlot 2002®.

4.4 EXPERIMENTO 3 - IMPACTOS DE MWCNT E NFC NAS MICROALGAS *CHLORELLA VULGARIS* E *KLEBSORMIDIUM FLACCIDUM*

4.4.1 Caracterização dos nanomateriais

4.4.1.1 Análise por difração de raio X (DRX)

Os difratogramas de raio X foram obtidos à temperatura ambiente e no intervalo de ângulos 2θ , variando de 5 a 40° . O aparelho utilizado foi um difratômetro universal de raio X, Carl-Zeiss-Jena URD6, a uma velocidade de $1,2^\circ/\text{min}$, operando a uma potência gerada de 40 kV e 20 mA e radiação de $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$).

4.4.2 Dispersão dos nanomateriais em meio *Bold's Basal* (BB) e água do Rio Sena

Amostras de água do Rio Sena foram coletadas no bairro *Quai Saint Bernard*, próximo à biblioteca *François Mitterrand* (Sistema de Posicionamento Global - GPS : 48.831039°N, 2.381709°E). Foram mensurados o pH (média de 8,0) e temperatura da água (média de 11,6° C). As amostras de água foram esterilizadas por filtração, utilizando-se filtros de acetato de celulose com poros de diâmetro 0,22 µm (Millipore). Apesar da filtragem, a água continha ácidos fúlvicos e húmicos. A água foi mantida a 4°C e representou o meio natural de referência para o crescimento de microalgas. A homogeneização das soluções e a dispersão dos NMs foram realizadas em banho-ultrasom durante 20 min para a produção de soluções-estoques (em meio BB ou água do Rio Sena estéril) na concentração de 1 mg ml⁻¹ para os MWCNTs e as NFCs.

4.4.3 Cultura de células de microalgas

As microalgas *C. vulgaris* e *K. flaccidum* obtidas na algoteca do Museu Nacional de História Natural da França, foram gentilmente cedidas pelo Dr. Claude Yéprémian. A densidade inicial das culturas foi de 5 x 10⁵ cel. mL⁻¹ em meio BB ou água do Rio Sena. As microalgas foram crescidas em frascos *erlenmeyer* de 250 ml, temperatura controlada (20±0,5° C), iluminação de densidade de fluxo de fótons 50-80 µmol m⁻² s⁻¹ (14 h luz e 10 h escuro) e aeração constante.

A exposição aos NMs foi baseada na norma 10253:ISO (1995). As microalgas, em crescimento exponencial, foram mantidas em contato com os NMs (MWCNT e NFC) nas concentrações de 0 (controle); 1; 50 e 100 µg ml⁻¹ por 24, 48, 72 e 96 h.

4.4.4 Estudo da interação física dos nanomateriais com as microalgas

4.4.4.1 Potencial Zeta (PZ)

A presença de cargas superficiais foi estimada via análise do Potencial Zeta (PZ) a partir de alíquotas das suspensões aquosas dos MWCNT e das NFC em meio BB ou água do Rio Sena. Suspensões dos NMs em diferentes pHs também foram avaliadas. Estas suspensões foram analisadas utilizando-se um equipamento Malverne 3000 Zetasizer NanoZS (Malverne

Instruments, UK). Cada suspensão foi avaliada em triplicata e no intervalo de tempo de 0, 24, 48, 72 e 96 h.

4.4.4.2 *Microscopia de luz*

A interação dos NMs com as células das microalgas foi observada com o auxílio de microscopia de luz (Zeiss Primo Star) após 24 h de contato com os MWCNTs ou com as NFCs ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$).

4.4.4.3 *Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (MET)*

Após 48 h de exposição aos MWCNTs e às NFC ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$), as microalgas foram fixadas em solução contendo 2,5% de glutaraldeído e 1,0% de ácido pícrico em PBS por 2 h. Após isto, lavou-se as células três vezes por 5 min com o mesmo tampão. Em seguida as células foram tratadas com tetróxido de Ósmio 1% por 2 h a 4°C e submetidas a uma desidratação à temperatura ambiente em uma bateria crescente de etanol (50%, 70%, 90% e 100%), uma vez por 10 min em cada concentração.

Para a MEV, terminada a desidratação, seguiu-se para a secagem pelo método do ponto crítico em CO_2 , onde o material ficou desprovido de etanol e então montados em suportes metálicos para observação. As amostras dos MWCNTs e NFCs foram montadas em suportes metálicos (*stubs*) e posteriormente, o material foi observado em microscópio eletrônico de varredura, (DSM 940, Zeiss). As imagens foram capturadas digitalmente, utilizando-se o programa *Digital Image Transfer*.

No caso da MET o material desidratado passou por infiltração e inclusão em parafina e foi cortado em ultramicrotomo (Reichert, Jung Ultracut E, Leica). Os cortes foram contrastados com acetato de uranila etanólico antes de visualização. As imagens foram obtidas em um equipamento Hitachi H-700 operando com voltagem a 75 kV e equipado com uma câmara Hamatsu.

4.4.5 Viabilidade celular pelo método de exclusão do Azul de Tripán

A densidade (número de células ml^{-1}) e a viabilidade celular das microalgas foram avaliadas com auxílio do contador celular CelloMetter Auto T4 (Nexcelom Bioscience). Para a avaliação da viabilidade celular, as células foram previamente coradas com Azul de Tripán (0,01%), que avalia a integridade da membrana celular. Para tanto, foram pipetados 40 μl da cultura com as microalgas de cada triplicata e concentração em tubos *eppendorf* e adicionados 10 μl de Azul de Tripán.

4.4.6 Análise da eficiência fotossintética

A eficiência quântica máxima do fotossistema II (F_v/F_m) foi avaliada utilizando-se o fluorômetro de amplitude de pulso modulado (PAM, Handy PEA, Hansatech Instruments). Essa técnica permite avaliar a eficiência fotossintética da célula vegetal em estudo.

A fluorescência inicial (F_0) foi medida em culturas de microalgas previamente adaptadas ao escuro por 30 min, usando luz $0,1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, e a fluorescência máxima (F_m) após um pulso saturante de 0,8 s ($> 3500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). A partir destes valores foram calculados os valores F_v/F_m , sendo F_v a fluorescência variável estimada pela diferença entre F_m e F_0 .

4.4.7 Atividade de Superóxido Dismutase (SOD)

Inicialmente as células foram lisadas mecanicamente com o auxílio de esferas (*beads*) de sílica por 15 min a 15.000 rpm. Posteriormente, foram recuperados os “pellets” contendo os componentes intracelulares que foram utilizados para as análises de atividade de SOD e quantificação de ATP.

A atividade da superóxido dismutase foi determinada utilizando o kit SOD 19160, segundo recomendações do fabricante. Esse ensaio usa a xantina e a xantina oxidase para gerarem radicais superóxidos que reagem com *2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-p-feniltetrazoliumclorido* para produzir formazan. Esta reação forma formazan, o qual absorve luz à 450 nm. A inibição da produção do cromógeno é proporcional à atividade da SOD presente na amostra.

Primeiramente, adicionou-se 20 µl de cada amostra de acordo com os respectivos tratamentos e replicatas em uma placa Elisa. Foram adicionados 20 µl de amostra do grupo controle no branco 2 (B2) e 20 µl de água deionizada (Milli-Q) no branco 1 (B1) e 3 (B3). Posteriormente, foram pipetados 200 µl de WST (*water-soluble tetrazolium salt*) em todos os poços. Adicionou-se 20 µl de tampão de diluição no B2 e B3. Foram adicionados 20 µl da enzima diluída em cada amostra e no B1.

Posteriormente, a placa foi incubada em estufa a 37°C por 20 min e procedeu-se a leitura das absorvâncias em espectrofotômetro, empregando comprimento de onda fixo de 450 nm no equipamento Multilabel Plate Reader (Perkin-Elmer, Massachusetts, MA, USA).

A atividade da enzima SOD (% taxa de inibição) foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$SOD \text{ activity (inhibition rate \%)} = \frac{\{(A_{blank 1} - A_{blank 3}) - A_{sample} - A_{blank 2}\}}{(A_{blank 1} - A_{blank 3})} \times 100$$

4.4.8 Bioluminescência de ATP

Os níveis intracelulares de ATP foram quantificados com o *kit ATP bioluminescent assay* (FL-AA) de acordo com as instruções do fabricante. O ATP é essencial na transformação da luciferina em luciferil adenilato, que é o substrato para a enzima luciferase. A degradação do luciferil adenilato em oxiluciferina é uma reação que emite luz visível. Essa luz pode ser quantificada em um luminômetro e é produzida em relação direta a concentração do ATP, como reagente limitante da reação. Foram pipetados 100 µl de cada amostra de acordo com os respectivos tratamentos e replicatas em uma placa Elisa. Em seguida, foi pipetado 100 µl de um mix *ATP assay* contendo enzima e tampão.

A luminescência foi lida em equipamento *Envision Multilabel Plate Reader* (Perkin-Elmer, Massachusetts, MA, USA). A concentração de ATP foi avaliada comparando-se a luminescência das amostras com uma curva padrão com concentrações conhecidas de ATP.

4.4.9 Análises estatísticas

Os resultados foram avaliados por ANOVA e as médias comparadas pelo teste de SNK com auxílio do pacote estatístico SAS, em sua versão 9.0. Os valores de P menores que 0,05 foram considerados significativos. Os resultados foram apresentados como médias ± EP

da média. Os gráficos foram gerados no programa SigmaPlot 2002® for Windows versão 8.0 (SPSS Inc., 2002).

4.5 EXPERIMENTO 4 - TRANSFECCÃO *IN VITRO* DE FIBROBLASTOS E EMBRIÕES BOVINOS UTILIZANDO MWCNT-COOH CONJUGADOS COM PLASMÍDEOS MARCADOS COM GFP (pGFP)

4.5.1 Obtenção do DNA exógeno

O plasmídeo pLGW foi desenvolvido no *Center for Genetic Engineering and Biotechnology* (Cuba) e foi gentilmente cedido pelo Dr. Jorge R. Toledo Alonso da Universidade de Conceição (Chile) para a realização deste estudo. O plasmídeo possui o gene que codifica a proteína verde fluorescente (GFP) sob o controle do promotor citomegalovírus (CMVP) (Fig. 10) e foi utilizado para determinar a capacidade de transfecção dos MWCNT-COOHs.

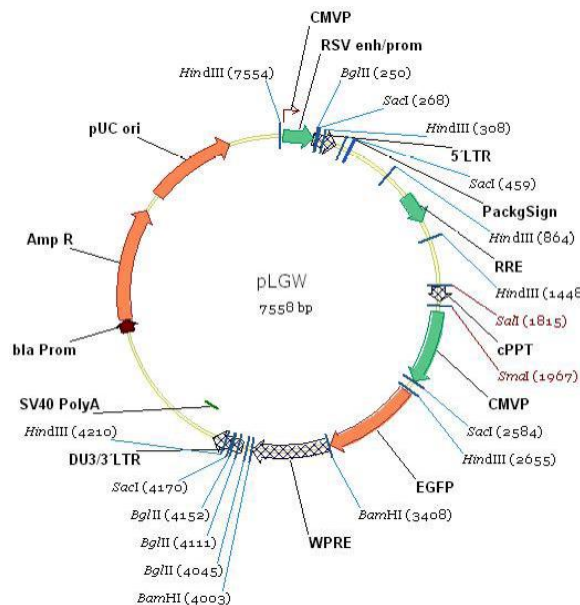


Figura 10. Mapa do vetor plasmidial pLGW (pGFP)

4.5.2 Transformação em *Escherichia coli*

A preparação das células competentes a partir da *Escherichia coli* DH5α e sua transformação com plasmídeos foi realizada segundo o método de choque térmico. Após o

descongelamento das bactérias *E. coli* em gelo foi adicionado 1 µL do plasmídeo em 100 µl de solução de bactérias. Em seguida as bactérias foram incubadas em gelo por 30 min, submetidas a choque térmico a 42° C por 30 seg e novamente colocadas no gelo durante 2 min. Adicionou-se 1 ml de meio LB (Luria Bertani) sem antibiótico e deixou-se por 60 min a 37° C, seguindo uma centrifugação por 10 min a 14.000 g. As bactérias foram ressuspensas em 100 µl de LB sem antibiótico e espalhadas sobre placas de Petri contendo 30 ml de meio LB-ágar suplementado com ampicilina (50 µg ml⁻¹). As placas foram incubadas à 37° C durante 12 h.

No dia seguinte, as colônias que possuíam maior tamanho e se apresentavam mais isoladas foram selecionadas e cultivadas em 2 a 5 ml de meio LB líquido com ampicilina a 37° C a 225 rpm por 8 h. Posteriormente, efetuou-se o congelamento das colônias a - 80°C em meio Caldo de Hanahan (SOB) com 25% (v/v) de glicerol.

4.5.3 Extração e purificação de DNA plasmidial

A purificação dos plasmídeos foi feita mediante o método químico de purificação do material genético por lise alcalina (SAMBROOK et al., 2001). A extração e purificação do DNA foram feitas em grande escala (Maxipreparados) utilizando o *Kit Qiagen Plasmid Midi and Maxi Purification Kits* (QIAGEN), segundo as instruções do fabricante. O sedimento de DNA obtido foi ressuspensado em água ultrapura estéril e armazenado a -20° C até a sua utilização.

4.5.4 Determinação da concentração e grau de pureza do DNA

O método usado para a determinação da concentração e do grau de pureza de DNA foi espectrofotométrica utilizando o equipamento NanoDrop 1000 (Termo Scientific). Na análise, a absorvância de 260 nm corresponde proporcionalmente à quantidade de ácidos nucleicos. O grau de pureza foi calculado por meio da relação A260/A280 onde foram preconizados valores entre 1,8 e 2,0 nm.

4.5.5 Digestão com enzimas de restrição

Após a quantificação espectrofotométrica, procedeu-se a digestão enzimática empregando-se endonucleases de restrição para confirmar a correta clonagem do plasmídeo pLGW. Os plasmídeos foram digeridos com as enzimas BamHI e NcoI (Invitrogen), por 2 h, a 37° C. Posteriormente, os fragmentos foram submetidos a eletroforese de gel de agarose a 1% por 40 min a 115V e 100 mA em tampão tris borato etilenodiamino tetra-acético (TBE) e corados com brometo de etídio (0,5 µg ml⁻¹). Por fim, os fragmentos foram visualizados no aparelho Fugi Fla 3000G Laser Scanner (Fugi FilmCo) (Fig. 11).

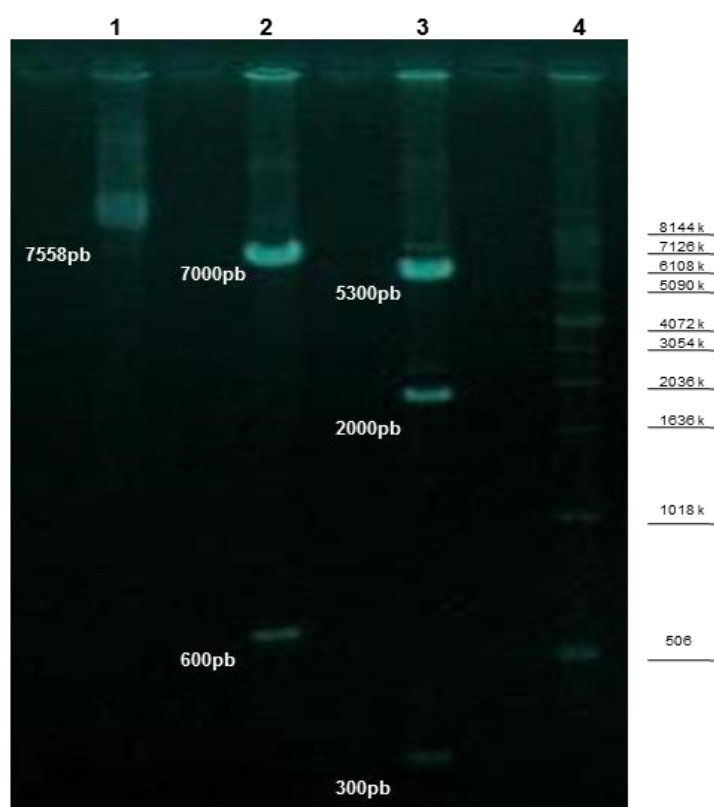


Figura 11. Gel de agarose 0,8% em TAE mostrando a digestão do plasmídeo pLGW com diferentes enzimas de restrição. Coluna 1: plasmídeo pLGW não digerido (fragmento de 7558 pb), coluna 2: plasmídeos digeridos com BamHI e liberação do fragmento de 600 pb. Coluna 3: plasmídeos digeridos com NcoI e liberação dos fragmentos de 2000 e 300 pb. Coluna 4: marcador de peso molecular (MP) de 1kb (Invitrogen).

4.5.6 Formação dos complexos MWCNT-COOH:pGFPs e ensaio de retardo da mobilidade eletroforética

Inicialmente foram realizadas padronizações da relação MWCNT-COOH:pGFP (10:1; 5:1 e 1:1) para a obtenção de taxas razoáveis de células GFP positivas comparado com um método de transfecção já estabelecido, o polímero catiônico polietilenoimina (PEI). Foram consideradas as concentrações de MWCNT-COOH não tóxicas para fibroblastos bovinos determinadas nos ensaios de viabilidade celular do experimento 1.

Após padronização, a melhor relação foi de $1,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ MWCNT-COOH para $0,3 \mu\text{g ml}^{-1}$ pGFP (5:1). Posteriormente, foi realizado o ensaio da mobilidade eletroforética em diferentes condições de complexação para detectar a eficiência da formação dos complexos MWCNT-COOH:pGFP, conforme descrito a seguir:

- MWCNT-COOH:pGFP incubado por 30 min a temperatura ambiente.
- MWCNT-COOH:pGFP em solução salina (150 mmol de ácido clorídrico -NaCl) incubado por 30 min a temperatura ambiente (LIU et al., 2011).
- MWCNT-COOH:pGFP incubado por 30 min em ultrassom com gelo (LADEIRA et al., 2010).
- PEI:pGFP na relação 1:1 - Sistema controle de transfecção, conforme descrito por Toledo et al. (2008).

Os diferentes complexos de MWCNT-COOH:pGFP e PEI:GFP foram submetidos a eletroforese de gel de agarose a 0,8% e corados com brometo de etídio. A corrida foi realizada nas mesmas condições do item 4.5.5.

4.5.7 Transfecção dos fibroblastos

Inicialmente, os fibroblastos foram semeados na densidade de 3×10^4 células/poço em placas de 4 poços (*Nunc*) por 48 h antes da transfecção. As células foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de SFB, 1% de antibiótico e incubadas a 37 °C, 5% CO₂ e 95% de umidade. Quando as células atingiram 60% de confluência, foram transfectadas com MWCNT-CHOO ou com o PEI complexados aos plasmídeos pGFP. O agente transfectante

PEI foi utilizado como método de carregamento gênico controle na relação de 1 µl de PEI para 1 µg de pGFP (1:1), conforme metodologia descrita por Toledo et al. (2008).

Imediatamente antes do momento da transfecção, o meio de cultura DMEM com soro foi retirado, as células foram lavadas, duas vezes, com 1 ml de DMEM sem soro. Em seguida, foram adicionado 400 µL de meio sem soro em cada poço.

Na transfecção com PEI, foram preparadas duas diluições, uma contendo o pGFP + glicose (5%) e outra contendo PEI (18 mM) + glicose (5%), ambas totalizando 100 µl cada. Após rápida homogeneização em vórtex, as soluções foram deixadas em repouso a temperatura ambiente durante 5 min. Em seguida, uniu-se a diluição de PEI à de pGFP homogeneizando-se em vórtex por cerca de 1 min. O *mix* permaneceu em repouso durante mais 15 min.

Os complexos de MWCNT-COOH e pGFP foram formados de acordo com a metodologia descrita no item 4.5.6. Após a análise de retardo da mobilidade eletroforética, foi utilizado o complexo MWCNT-COOH:pGFP em solução salina (150 mmol de NaCl) incubado por 30 min a temperatura ambiente. Em etapa posterior a formação dos complexos de PEI:pGFP e MWCNT-COOH:pGFP, trocou-se novamente o meio de cultivo para assegurar que todo o soro fosse removido dos poços. Em seguida, foram acrescentados aos tubos dos complexos DMEM sem SFB, totalizando 400 µl de mix total para cada agente transfectante. Em cada um dos 4 poços das replicatas foram pipetados 100 µl dos complexos produzidos, totalizando um volume de transfecção final de 500 µl por poço.

Os complexos MWCNT:pGFP e PEI:pGFP foram mantidos em contato com as células por 5 h, período após o qual o meio foi novamente trocado por DMEM a 10% de SFB e 1% de antibiótico, procedendo-se normalmente o cultivo.

Foram totalizadas três repetições, cada uma com três replicatas por tratamento. Abaixo estão descritos os grupos de transfecção em fibroblastos bovinos:

- fibroblastos cultivados *in vitro* sem MWCNT-COOH e sem pGFP.
- fibroblastos cultivados *in vitro* com pGFP puro.
- fibroblastos cultivados *in vitro* com complexos MWCNT-COOH e pGFP
- fibroblastos cultivados *in vitro* com complexos PEI e pGFP

4.5.8 Transfecção dos embriões

Os embriões foram produzidos *in vitro* conforme a metodologia descrita no item 4.3.2. Após 6 h de fertilização *in vitro*, embriões de 1 célula foram expostos aos complexos MWCNT:pGFP (de acordo com as concentrações descritas abaixo) em microgotas de 50 µl de CR2aa sem SFB por 12 h e posteriormente transferidos para meio CR2aa suplementado com 5% de SFB cobertas com óleo mineral em 5% de O₂, 5% de CO₂ e 38,5° C por 72 h. Esse momento de desenvolvimento foi escolhido, pois os cromossomos maternos e paternos estão descondensados (WALTERS et al., 2006), fato que pode favorecer a incorporação do DNA exógeno.

Nesta etapa, foram avaliadas concentrações diferentes de MWCNT-COOH conjugados com carreadores pGFP conforme segue:

- cultivo de presumíveis zigotos fecundados *in vitro* sem MWCNT-COOH e sem pGFP.
- cultivo de zigotos com complexos de 1 µl MWCNT-COOH (0,2 µg) e 1 µl de pGFP (0,2 µg) na proporção de 1:1 em 50 µl de meio de cultivo.
- cultivo de zigotos com complexos 10 µl de MWCNT-COOH (2 µg) e 1 µl de pGFP (0,2 µg) na proporção de 10:1 em 50 µl de meio de cultivo.
- cultivo de zigotos com complexos 20 µl de MWCNT-COOH (4 µg) e 1 µl de pGFP (0,2 µg) na proporção de 20:1 em 50 µl de meio de cultivo.

4.5.9 Microscopia de fluorescência

A expressão de GFP nos fibroblastos foi observada 24 h após a transfecção. Para os embriões, a expressão de GFP foi avaliada em embriões com 2, 4, 8 células (72 h após fertilização), e posteriormente nos blastocistos com 7 dias de cultivo *in vitro*. A expressão da proteína GFP foi observada por microscopia de fluorescência usando filtro de 470-490 nm do microscópio de epifluorescência (BX 52, Olympus, Washington, EUA).

4.5.10 Citometria de fluxo

Para os fibroblastos, foram realizadas análises adicionais de expressão de GFP por citometria de fluxo. As células previamente visualizadas em microscopia que expressaram a

proteína GFP foram tripsinizadas, lavadas em PBS, centrifugadas a 18 rpm por 5 min e ressuspendidas em PBS. Posteriormente, as células foram submetidas ao citômetro com laser de 488 nm. As células transfectadas expressando GFP emitiram fluorescência a 509 nm que foram captadas pelo filtro FL1 (fluorescência verde - 530/30 nm) do citômetro de fluxo. A porcentagem de células expressando a proteína exógena foram determinadas com o auxílio do software WinMDI versão 2.9.

4.5.11 Detecção de GFP por PCR em tempo real

O DNA genômico dos fibroblastos e dos embriões foram extraídos após incubação das células ou dos embriões em proteinase K (Roche) para a digestão de proteínas por 2 h a 50° C e 10 min a 95° C. Os embriões foram avaliados individualmente e no caso dos fibroblastos foram utilizados 1×10^5 células por reação de PCR. A quantidade e qualidade do DNA extraído foram analisadas por espectrofotômetro (Nanodrop ND-1000, Wilmington, EUA). Para a detecção do DNA exógeno inserido no DNA genômico por PCR foi construído um par de *primers* específicos para a amplificação de um fragmento de 200 pb do gene da GFP (5' TGGGCGTGGATAGCGGTTTGAC 3' do *primer forward* e foi 5' AAGCCAGTAAGCAGTGGGTTCTCTA 3' do *primer reverse*). Cada reação de PCR consistiu de 5 µl de DNA molde, par de *primers*, 12,5 µl de Master Mix (dNTPs, referência passiva-ROX, SYBER Green) e 0,1 U de DNA polimerase derivada da *Thermus aquaticus* (Taq), em um volume final de 25 µl, foi incubada a 95° C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 95° C por 15 seg, temperatura de pareamento de 61° C por 30 seg e extensão a 60° C por 30 seg.

Os produtos das reações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% corados com Brometo de Etídeo, conforme metodologia descrita no ítem 4.5.5.

4.5.12 Análises estatísticas

Dados das técnicas de citometria de fluxo foram avaliados pela ANOVA e a taxa de embriões transgênicos pelo teste de Qui-quadrado. As diferenças entre médias foram comparadas pelo teste de SNK com auxílio do programa estatístico SAS 9. Os valores de P menores que 0,05 foram considerados significativos. Os resultados foram apresentados como médias \pm EP da média. Os gráficos foram gerados no programa SigmaPlot 2002®.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 EXPERIMENTO 1 - AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA CITOTOXICIDADE DE NFC E MWCNT-COOH EM FIBROBLASTOS BOVINOS

5.1.1 Caracterização dos nanomateriais

5.1.1.1 Microscopia eletrônica de transmissão

A Figura 12 apresenta as estruturas típicas das NFCs e MWCNT-COOHs obtidas por MET. As NFCs mostraram diâmetro de 6-18 nm e comprimento variando de 85-225 μm (Fig 12A, B) enquanto os MWCNT-COOH apresentaram diâmetro externo de 10 a 50 nm e comprimento estimado de 5 a 30 μm (Fig. 12C, D).

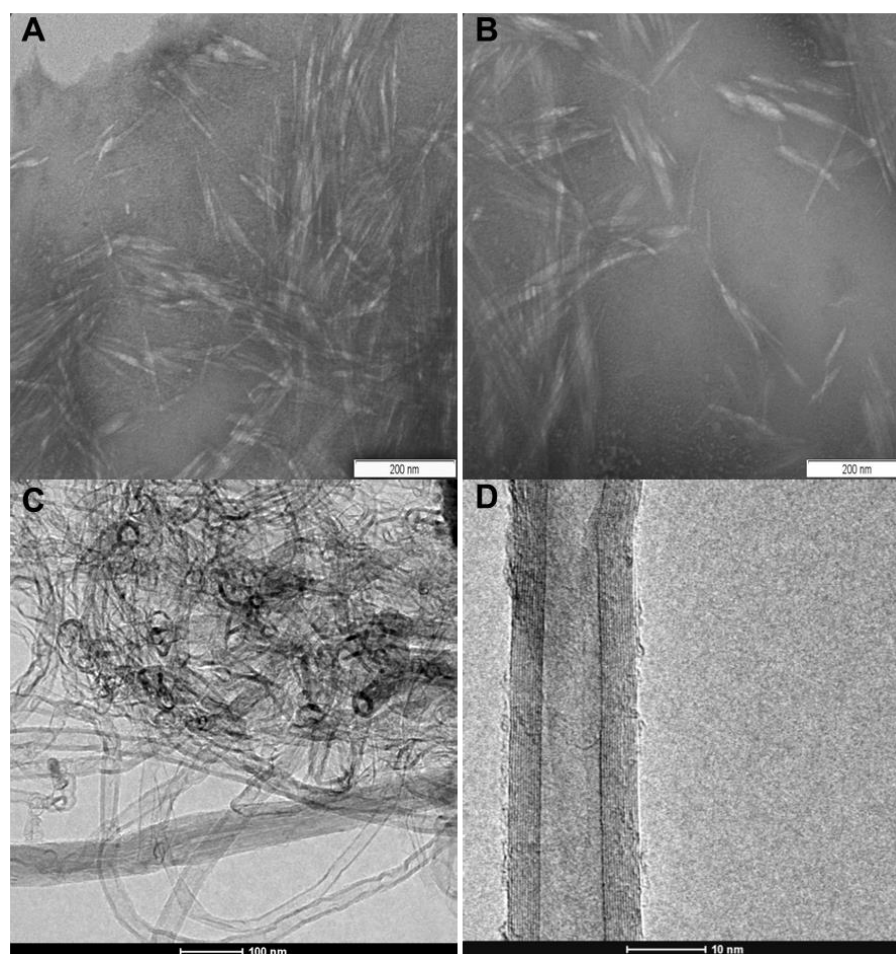


Figura 12. Micrografias de microscopia eletrônica de transmissão (MET) de NFC (A, B) e MWCNT-COOHs (C, D).

5.1.1.2 Análise termogravimétrica

A estabilidade térmica das NFCs e dos MWCNT-COOH pode ser verificada através das curvas TGA/DTG como mostram as Figuras 13 e 14. A Figura 13 apresenta as curvas TG e DTG para a celulose nas três etapas de produção: fibras de celulose (linha vermelha), NFCs secas em estufa (linha escura) e NFCs liofilizadas (linha verde). A análise revelou a presença de basicamente três eventos térmicos principais que se referem a etapa máxima de decomposição dos materiais. As NFCs liofilizadas que foram utilizadas no presente estudo apresentaram a temperatura de degradação de 250°C.

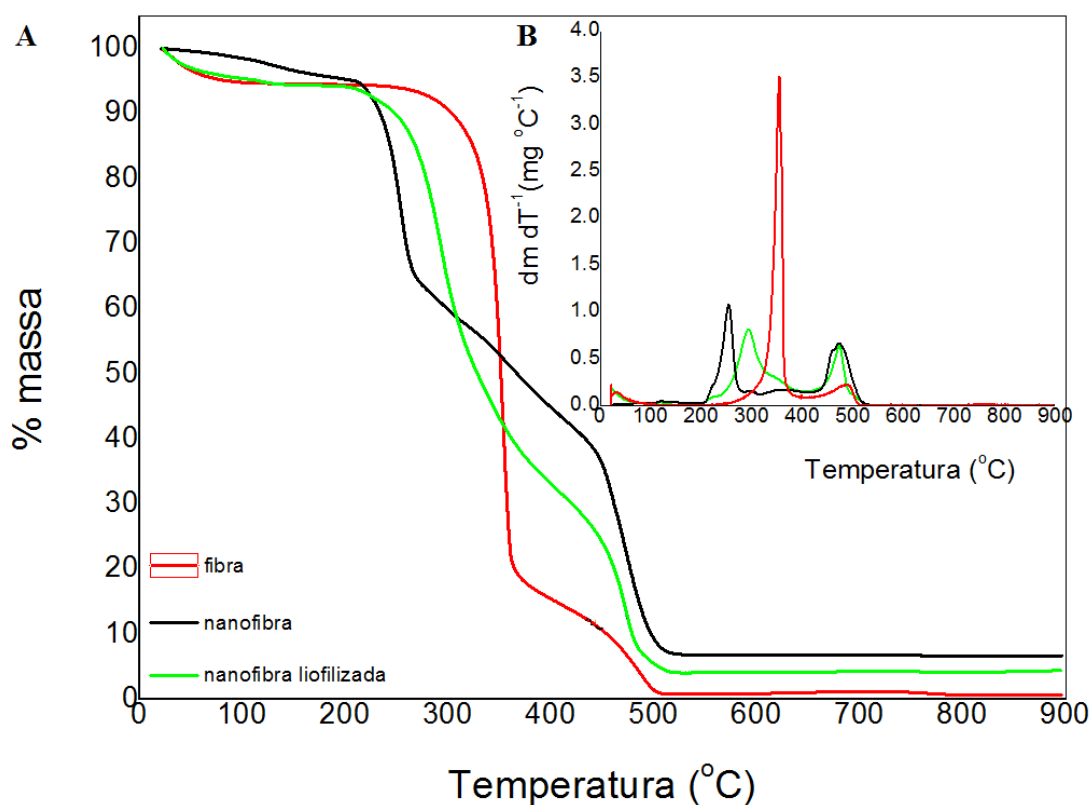


Figura 13. **A:** Curvas Termogravimetria (TG) e **B:** Termogravimetria Derivada (DTG) para as fibras de celulose, nanofibras secas em estufa e nanofibras liofilizadas.

Para os MWCNT-COOHs a degradação térmica é manifestada como um único evento principal, refletindo em um pico na curva DTG de 585°C bastante definido (Fig. 14).

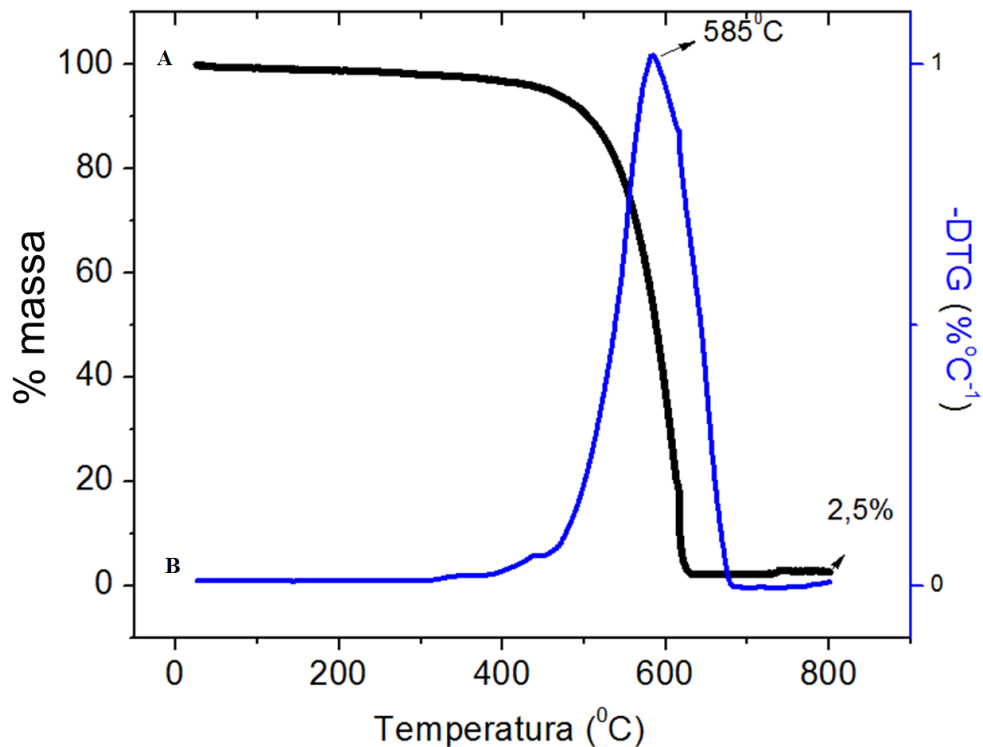


Figura 14. **A**: Curvas Termogravimetria (TG) e **B**: Termogravimetria Derivada (DTG) para os MWCNT-COOHs.

Os perfis das curvas termogravimétricas são semelhantes aos reportados na literatura tanto para as NFCs (TEIXEIRA et al., 2010) quanto para os MWCNT-COOH (WU et al., 2013).

5.1.2 Análise de viabilidade celular por citometria de fluxo

Nos ensaios com as NFCs, a viabilidade celular não foi afetada ($P = 0,06$) após a exposição nas concentrações de 0,02 ($92,37 \pm 1,31\%$), 0,20 ($94,00 \pm 1,29\%$), 0,50 ($92,33 \pm 1,35\%$), 1,00 ($92,25 \pm 1,37\%$), 1,50 ($89,93 \pm 1,17\%$) e $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ NFC ($90,78 \pm 3,20\%$) comparada ao grupo controle ($94,27 \pm 1,52\%$) (Fig. 15). Porém, houve redução na viabilidade celular ($P = 0,001$) nas concentrações de 200 ($86,41 \pm 5,37\%$), 400 ($86,32 \pm 1,31\%$), 800 ($76,79 \pm 2,74\%$), 1000 ($71,94 \pm 2,76\%$) 2000 ($67,99 \pm 4,63\%$), 3000 ($55,97 \pm 2,37\%$) e $5000 \mu\text{g ml}^{-1}$ NFC ($36,51 \pm 2,58\%$) (Fig. 15). Portanto, foi constatado que as concentrações de NFCs acima de $200 \mu\text{g ml}^{-1}$ são tóxicas para fibroblastos bovinos cultivados *in vitro*. Neste estudo foi encontrada a concentração de NFCs que causou a morte de mais de 50% das células ($5000 \mu\text{g ml}^{-1}$).

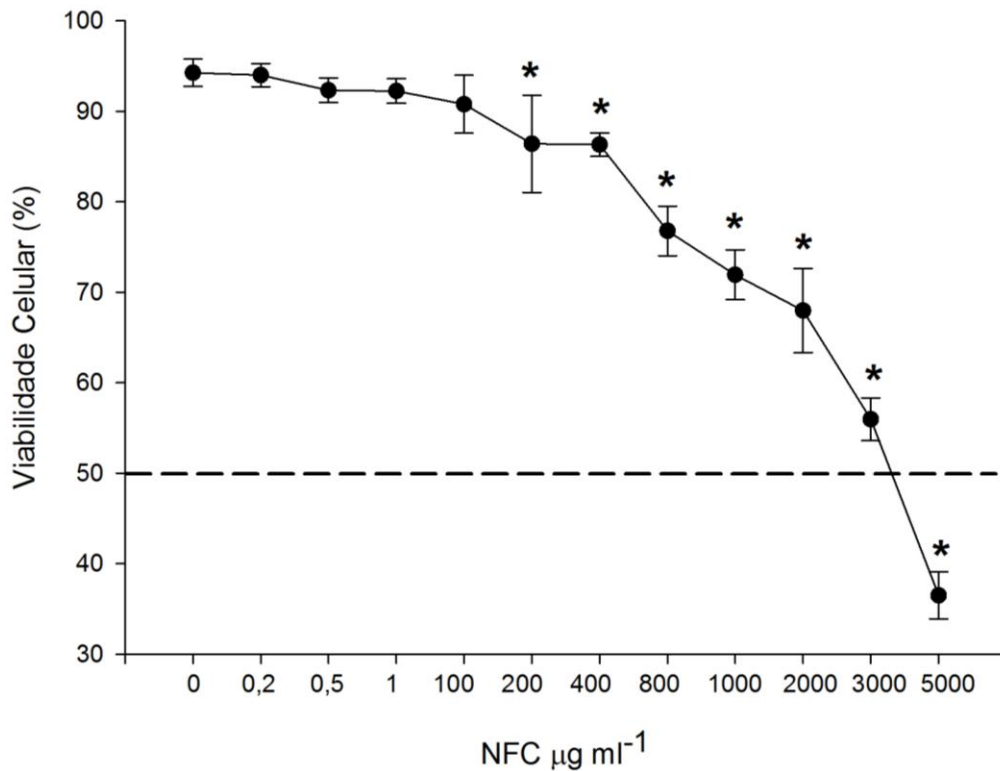


Figura 15. Análise da viabilidade celular de fibroblastos expostos as NFCs por citometria de fluxo. Médias das porcentagens de células viáveis após exposição às concentrações de 0 (controle); 0,2-5000 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de NFC por 24 horas. A linha pontilhada horizontal representa 50% de morte celular (CL50%) *Diferenças significativas entre os grupos expostos às NFCs e o controle são indicados por $P=0,001$.

Para a determinação da concentração de MWCNT-COOH que fosse letal a aproximadamente 50% das células, utilizou-se inicialmente as mesmas concentrações que as utilizadas para as NFCs. Em fibroblastos expostos aos MWCNT-COOHs, as células não apresentaram alterações na viabilidade celular ($P=0,52$) nas concentrações de $0,02 \mu\text{g ml}^{-1}$ ($89,75 \pm 1,15$); $0,2 \mu\text{g ml}^{-1}$ ($90,37 \pm 1,62$); $0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ ($88,41 \pm 1,50$); $1,0 \mu\text{g ml}^{-1}$ MWCNT-COOH ($91,4 \pm 0,93$) quando comparado ao controle ($91,54 \pm 0,88$) (Fig. 16). Porém, nas concentrações de $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ ($65,88\% \pm 1,77$), $200 \mu\text{g ml}^{-1}$ ($56,64\% \pm 1,79$) e $400 \mu\text{g ml}^{-1}$ MWCNT-COOH ($46,93 \pm 3,27$) a viabilidade celular foi alterada ($P=0,001$) (Fig. 16).

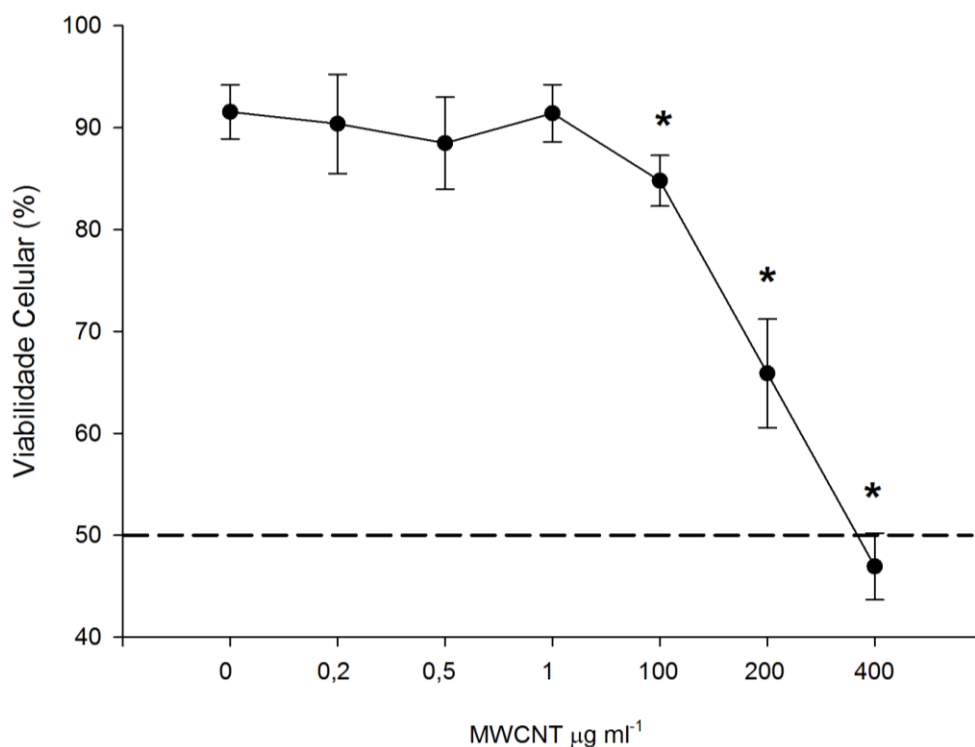


Figura 16. Análise da viabilidade celular de fibroblastos expostos aos MWCNT-COOHs por citometria de fluxo. Médias das porcentagens de células viáveis após exposição às concentrações de 0 (controle); 0,2-400 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de MWCNT-COOH por 24 horas. A linha pontilhada horizontal representa 50% de morte celular (CL50%).*Diferenças significativas entre os grupos expostos aos MWCNT-COOHs comparados ao grupo controle são indicados por $P=0,001$.

Os resultados do ensaio de viabilidade celular demonstraram que a concentração que matou mais que 50% das células para os MWCNT-COOH (400 $\mu\text{g ml}^{-1}$) foi menor que para as NFCs (5000 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Esta diferença, possivelmente está relacionada a natureza físico-química desses NMs (CLIFT et al., 2011; ZHANG et al., 2012).

Características como tamanho, forma, composição química, estrutura de superfície, solubilidade e agregação são importantes para a compreensão dos mecanismos de toxicidade dos NMs (OBERDORSTER, OBERDORSTER e OBERDORSTER, 2005a; ARORA et al., 2012). Com a diminuição do tamanho das partículas a área de superfície aumenta exponencialmente e uma grande proporção de átomos ou moléculas tornam-se potencialmente reativas (DENG et al., 2009; SHARMA, 2010). As análises de caracterização realizadas no presente estudo demonstraram que os MWCNT-COOH são menores em comprimento (5-30 μm) quando comparado às NFCs (85-225 μm) (Fig. 12). Devido a esse fato, possivelmente, o menor tamanho dos MWCNT-COOHs associado a sua composição química e outras

características físicas podem ter influenciado seu efeito citotóxico sobre os fibroblastos bovinos em menores concentrações em relação às NFCs.

Os NTCs tem o potencial de lesionar as membranas celulares devido a sua elevada resistência mecânica (BIANCO, KOSTARELOS e PRATO, 2005). Adicionalmente, apesar das NFCs e dos MWCNT-COOH possuírem morfologia semelhante a “agulha” (Fig. 12) que geralmente leva a toxicidade forma dependente, as NFCs possuem caráter biodegradável (KOLAKOVIC et al., 2011) que podem determinar menor toxicidade desses NMs.

De fato, no presente trabalho, dados de citometria de fluxo revelaram perda da integridade das membranas e diminuição da viabilidade dos fibroblastos expostos a concentrações de 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ MWCNT-COOH enquanto em NFCs isso ocorreu em concentrações acima de 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

A concentração parece ser determinante para a toxicidade de diferentes NMs (SOHAEBUDDIN et al., 2010; ZHAO e LIU, 2012). Estudos anteriores demonstraram que as NFCs em baixas concentrações (0,005-1 $\mu\text{g ml}^{-1}$) não induziram efeitos tóxicos em fibroblastos de camundongos ou células de tecido pulmonar humano (MOREIRA et al., 2009; CLIFT et al., 2011; LIMA et al., 2012). Similarmente, no presente estudo a concentração de 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ NFC não diminuiu a viabilidade de fibroblastos bovinos cultivado *in vitro* (Fig. 15). Por outro lado, foram encontradas concentrações que diminuiram a viabilidade celular a menos de 50%. Outros estudos constataram que altas concentrações (1000 $\mu\text{g ml}^{-1}$) acarretaram na maior taxa de morte celular quando comparada as células expostas a menores concentrações (10 $\mu\text{g ml}^{-1}$) do mesmo NM (MAHMOOD et al., 2010; SOHAEBUDDIN et al., 2010).

No caso dos NTCs, estes penetram nas células por endocitose ou passam livremente pela bicamada lipídica (AHMED et al., 2009; PACURARI et al., 2012). Com relação às NFC, Clift et al. (2011) observaram a presença destes materiais no interior das células pulmonares humanas, porém ainda não são conhecidos os mecanismos pelos quais essas nanofibras entram nas células. No presente estudo, em ambos os NMs, a medida que foi aumentada a concentração, a viabilidade celular foi diminuída. A entrada de NMs nas células pode causar danos as membranas plasmáticas, ao DNA e ao compartimento endossômico (NEL et al., 2009; LIMA et al., 2012). Nesse estudo, possivelmente, o aumento da concentração de MWCNT-COOH e NFC pode ter resultado em proporcional entrada destes nas células e causado lesão em organelas e estruturas celulares, resultando em uma perda de viabilidade celular dose dependente. Suzuki, Toyooka e Ibuki (2007) constataram que houve maior

incorporação de nanopartículas de TiO₂ por células ovarianas de hamster, quando estas células foram expostas a elevadas concentrações deste NMs. Contudo, estudos adicionais ainda são necessários para determinar os mecanismos pelos quais as NFCs e os MWCNT-COOHs induzem a citotoxicidade em fibroblastos bovinos cultivados *in vitro*.

A toxicidade de MWCNT-COOH em menores concentrações quando comparada as NFCs também pode estar relacionada aos mecanismos pelos quais a exposição a esses NMs induzem a morte celular. A apoptose geralmente ocorre pela produção de EROs, danos ao DNA, deprivação de fatores de crescimento ou baixa quantidade de nutrientes (HENGARTNER, 2000). Os NTCs são capazes de induzir a apoptose em diversos tipos celulares como linfócitos e células renais humanas (CUI et al., 2005; BOTTINI et al., 2006), fibroblastos e células epiteliais de camundongos (RAVICHANDRAN et al., 2009; SOHAEBUDDIN et al., 2010), provavelmente por gerar EROs (SCHRAND et al., 2007). Em NFCs, são escassas as informações sobre seus efeitos citotóxicos, principalmente aqueles relacionados aos mecanismos que desencadeiam a apoptose. Um estudo em célula vegetal revelou que as NFCs podem causar efeitos genotóxicos (LIMA et al., 2012), dano que geralmente desencadeia a morte celular.

Em baixas concentrações os NMs podem causar danos celulares primeiramente pela produção de EROs ou danos ao DNA. Por outro lado, em altas concentrações, possivelmente fatores adicionais influenciam na intensidade das alterações na homeostase celular. Alguns estudos relataram que os NTCs podem alterar a disponibilidade de componentes dos meios de cultura importantes para a manutenção das atividades celulares (CASEY et al., 2008; GUO et al., 2008). Portanto, altas concentrações de NMs também podem desencadear a morte celular por diminuir a disponibilidade de fatores de crescimento ou nutrientes nos sistemas de cultivo *in vitro*.

5.1.3 Estudo da interação dos nanomateriais com os fibroblastos por microscopia de luz e citometria de fluxo

As imagens de microscopia de luz invertida de fibroblastos expostos às NFCs ou aos MWCNT-COOHs demonstraram que, no geral, as células apresentaram uma morfologia típica de fibroblastos e cresceram em monocamada aderente. Porém, observou-se que dependendo do NM estudado e quanto maior a concentração deste maior a alteração morfológica celular, tal como pode ser observado nas Figuras 17B-D e 18B-D.

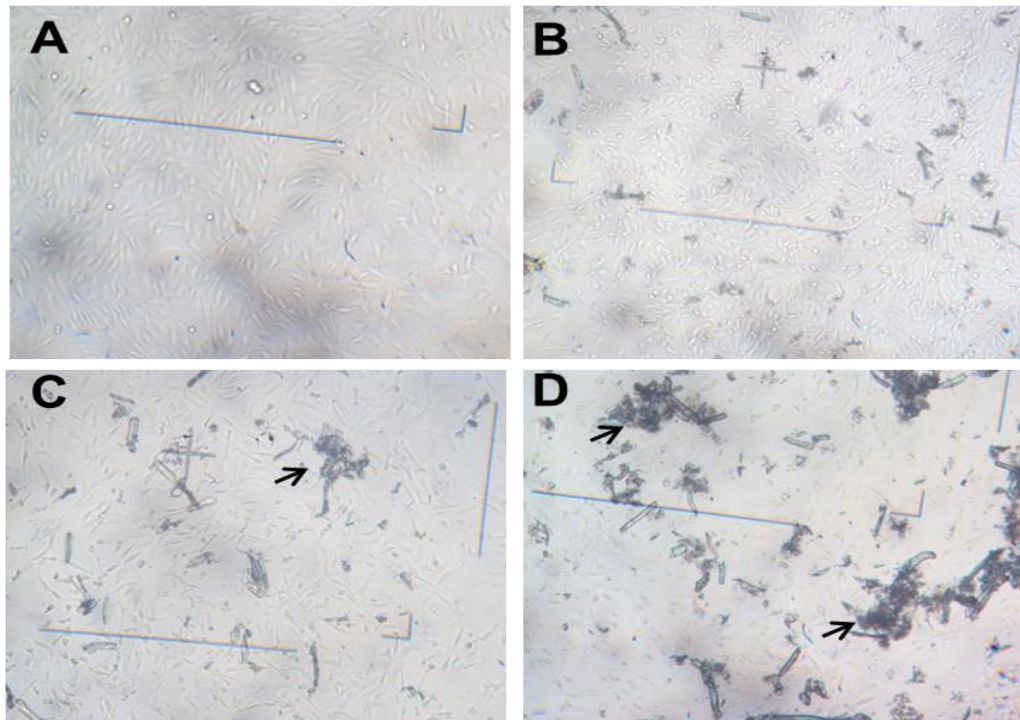


Figura 17. Fotomicrografias de fibroblastos bovinos incubados por 24 horas com diferentes concentrações de NFC. (A) Células cultivadas em meio de cultura celular DMEM (grupo controle); (B) Células expostas a $100 \mu\text{g ml}^{-1}$; (C) $200 \mu\text{g ml}^{-1}$ (D) e $3000 \mu\text{g ml}^{-1}$ de NFC. As setas destacam a formação de agregados. Aumento de 40 X.

Em ambos os NMs verificou-se a formação de agregados em cultura, principalmente em altas concentrações (Fig. 17 e 18). Já é bem conhecido que os NMs espontaneamente possuem a tendência de formarem agregados ou aglomerados (RODEA-PALOMARES et al., 2011). Isso ocorre, dentre outros fatores, devido às interações de van der Waals que são dominantes em materiais na escala “nano” (ZANGMEISTER et al., 2007; LEE e GECKELER, 2010). O processo de agregação pode torna-se maior quando em contato com os meios de cultura celular. Os componentes dos meios podem aumentar ou diminuir a aglomeração, dependendo da ação de Ca^{2+} ou soro, respectivamente (SOHAEBUDDIN et al., 2010), bem como influenciar a distribuição de tamanho dos agregados. A maioria dos componentes dos meios de cultura favorece a aglomeração, porém Murdock et al. (2008) observaram que a presença de proteínas pode reduzir a atração entre os NMs. Isso ocorre devido à adsorção de proteínas à superfície dos NMs “revestindo-o” e impedindo a interação entre partículas com a mesma composição.

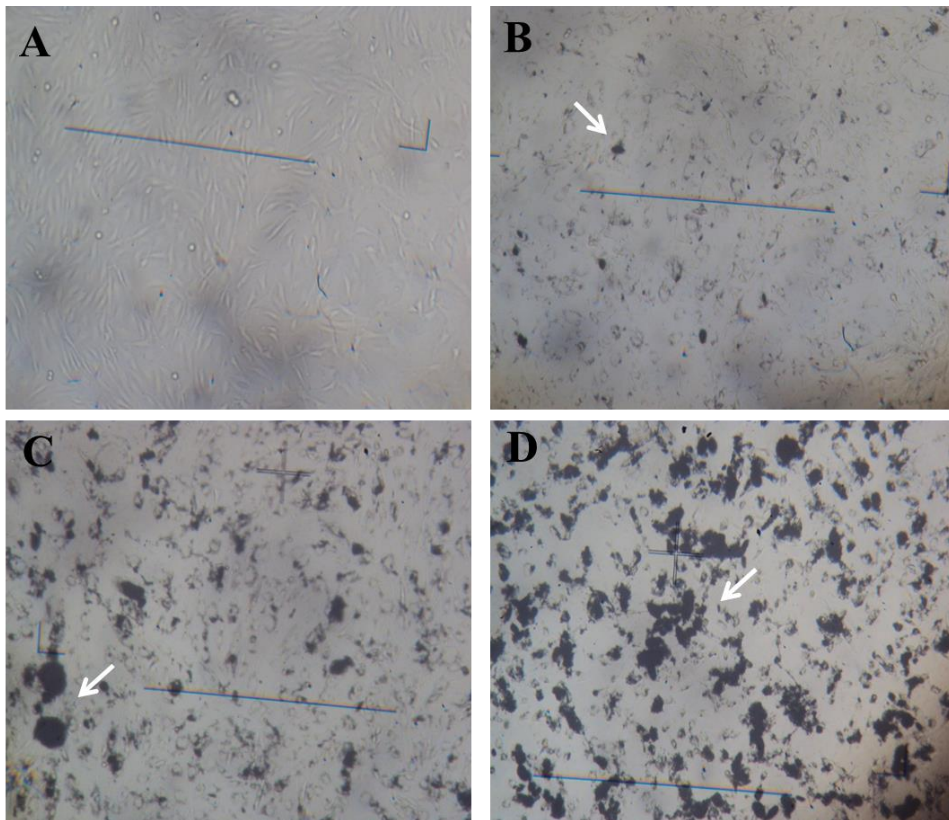


Figura 18. Fotomicrografias de fibroblastos bovinos incubados por 24 horas com diferentes concentrações de MWCNT-COOH. (A) Células cultivadas em meio de cultura celular DMEM (grupo controle); (B) Células expostas a $25 \mu\text{g ml}^{-1}$; (C) $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ (D) e $400 \mu\text{g ml}^{-1}$ de MWCNT-COOH. As setas destacam a formação de agregados. Aumento de 40 X.

A aglomeração diminui a concentração dos NMs dispersos, enquanto a massa total de NM adicionada ao meio de cultura permanece inalterada, influenciando as respostas biológicas. Wick et al. (2007) e Dhawan, Sharma e Parmar (2009) relataram que os NTCs dispersos foram menos citotóxicos quando comparados àqueles agregados. Estes mesmos autores sugerem que a aglomeração pode alterar as características morfológicas dos NMs. Outro possível efeito consiste na deposição dos agregados de NMs sobre a monocamada celular aderida a placa de cultura acarretando em ação mecânica sobre as células. Estudos anteriores reforçam essa hipótese, uma vez que os efeitos nocivos de MWCNTs na viabilidade celular foram atribuídos à tendência desses NMs formarem agregados (SMART et al., 2006; DAVOREN et al., 2007). Por outro lado, Lima et al. (2012) demonstraram que a agregação de NFCs pode estar relacionada a menores efeitos tóxicos. Assim, a agregação ou aglomeração é um importante fator que deve ser avaliado para melhor entendimento do potencial citotóxico dos NMs (BAVEYER e LABA, 2008).

Para compreender melhor os efeitos da interação das NFCs ou dos MWCNT-COOH e os fibroblastos bovinos cultivados *in vitro*, foram realizadas análises qualitativas de alterações da morfologia e tamanho celular por citometria de fluxo. As células exposta a baixas concentrações de NFCs ou MWCNT-COOHs (0,2 a 1,0 $\mu\text{g ml}^{-1}$) não apresentaram alterações nos parâmetros *Side Scatter Signal* (SSC) e *Forward Scatter Signal* (FSC) quando comparado ao grupo controle (Fig. 19 e 20). Entretanto, as células cultivadas em contato com altas concentrações de NFCs ou MWCNT-COOHs apresentaram aumento do SSC e diminuição do FSC (Fig. 19 e 20).

A leitura das células pelo citômetro é baseada na dispersão da luz que fornece diversas informações acerca da célula. A medida de dispersão lateral de luz, chamada SSC está relacionada a característica de complexidade interna da célula enquanto a de dispersão frontal de luz chamada FSC está relacionada ao tamanho (CAI et al., 2008). Assim, essas informações são úteis na avaliação do tamanho e forma celular.

Estudos anteriores observaram as mesmas alterações nos parâmetros SSC e FSC em células expostas a diferentes NMs. Cai et al. (2008) observaram que o aumento de SSC foi proporcional a quantidade de NTC complexados às células T de camundongos. Semelhantemente, Sohaebuddin et al. (2010) e observaram um aumento no parâmetro SSC em fibroblastos e macrófagos de camundongos expostos a 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ MWCNT. Nanopartículas de TiO_2 causaram aumento de SSC em células de retina humanas (ZUCKER et al., 2010). Estes autores atribuíram este aumento a presença de NMs adsorvidos ou endocitados à célula. Particularmente, Suzuki, Toyooka e Ibuki (2007) constataram que elevadas concentrações de nanopartículas de TiO_2 (100 a 1000 $\mu\text{g ml}^{-1}$) causaram maior aumento no parâmetro de SSC quando comparado a baixas concentrações (10 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Esses resultados foram embasados por achados de microscopia obtidos no mesmo estudo que demonstraram a incorporação citoplasmática dose-dependente de nanopartículas de TiO_2 marcadas com sondas fluorescente.

Células monoblastoides humanas expostas a nanopartículas de TiO_2 apresentaram diminuição de FSC e este resultado foi relacionado ao encolhimento celular e alterações citoplasmáticas que são características da fase inicial da apoptose (VAMANU et al., 2008).

A citometria de fluxo é uma tecnologia rápida e precisa que analisa as propriedades ópticas de um grande número de células individualizadas e vem sendo utilizada para monitorar as interações físicas entre os NMs e as células (SUZUKI, TOYOOKA e IBUKI,

2007; CAI et al., 2008; VAMANU et al., 2008; SOHAEBUDDIN et al., 2010; ZUCKER et al., 2010).

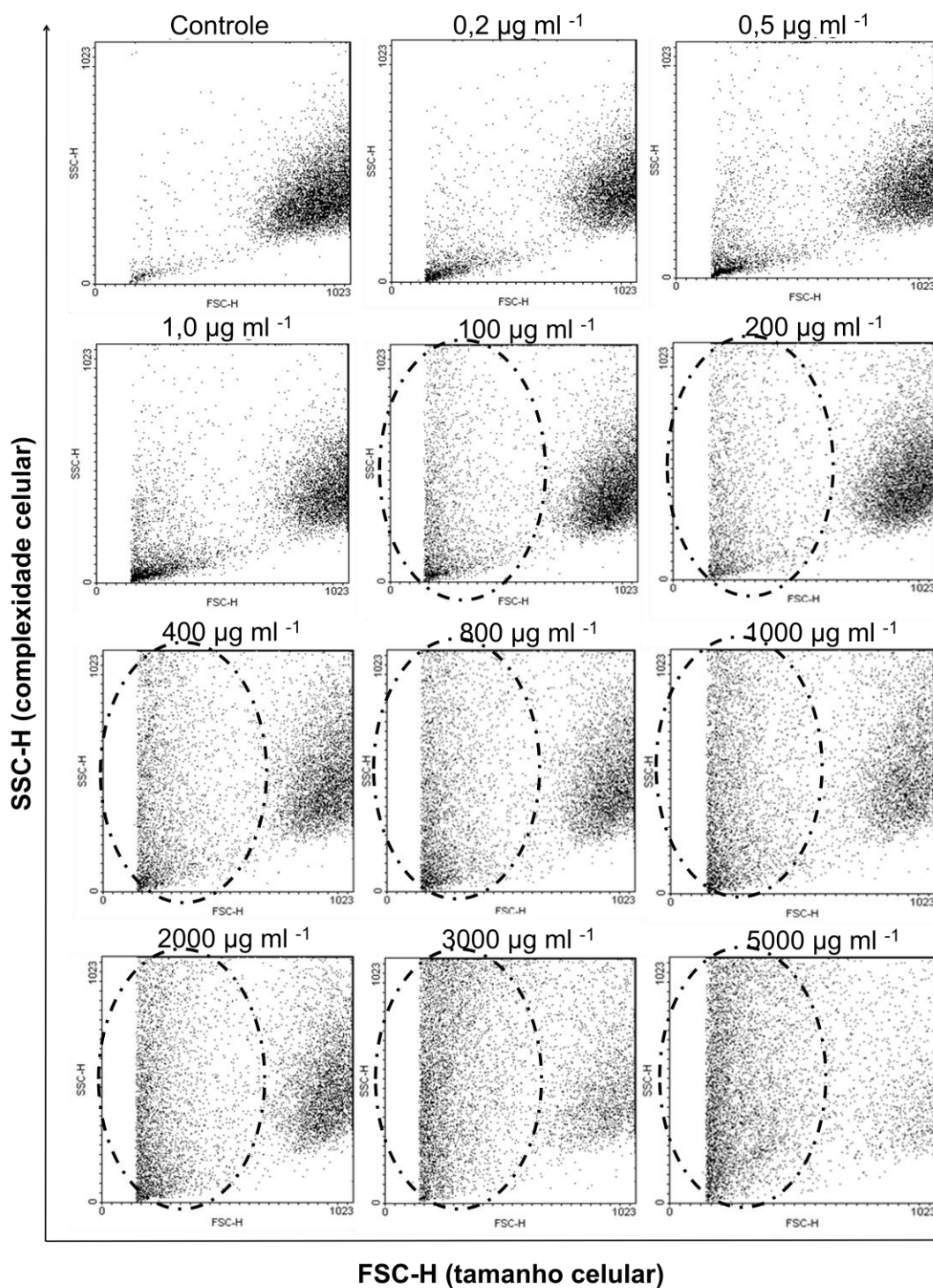


Figura 19. Influência de diferentes concentrações de NFCs sobre a morfologia de fibroblastos bovinos após 24 horas de cultura *in vitro*. Citograma bidimensional em *dot plot* de SSC (escala logarítmica) X FSC (escala linear).

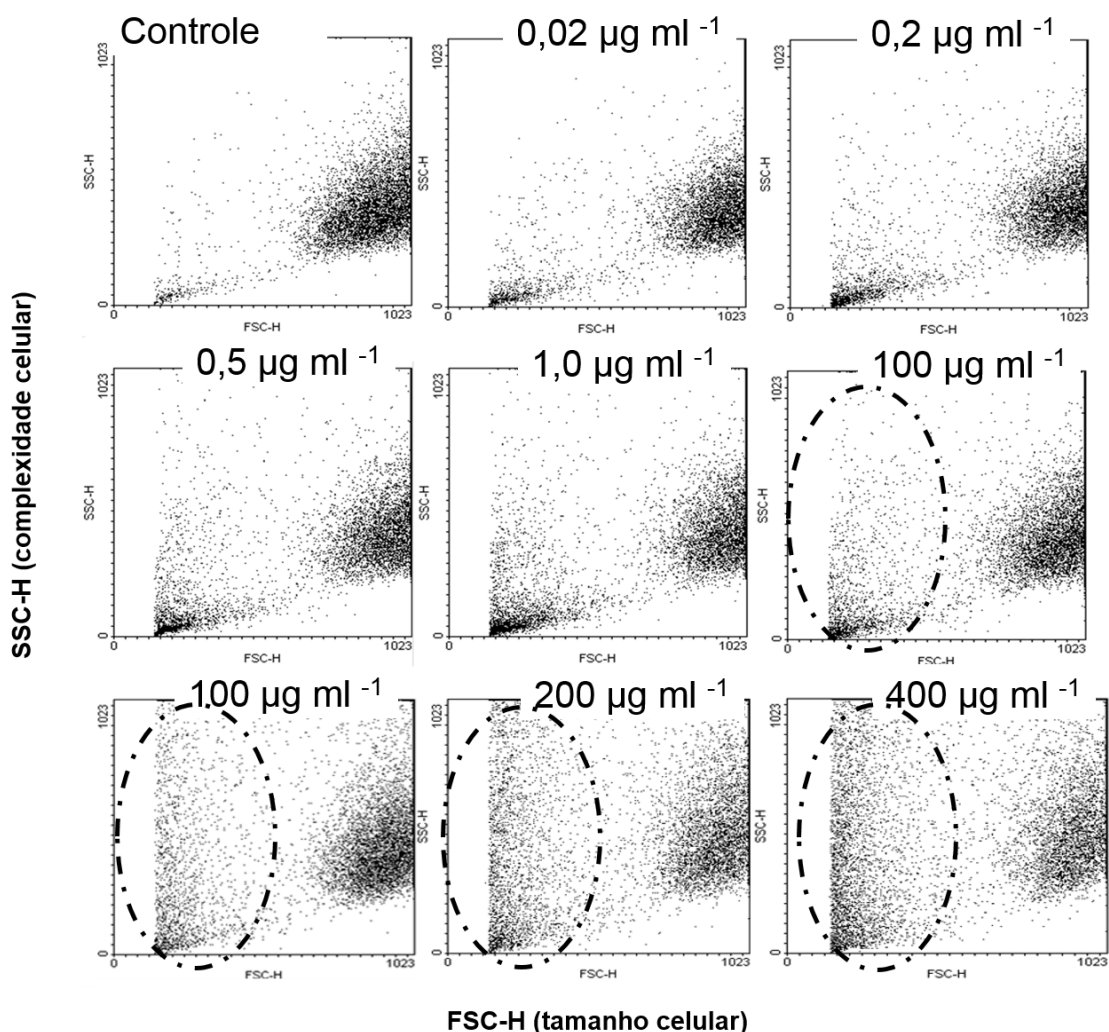


Figura 20. Influência de diferentes concentrações de MWCNT-COOHs sobre a morfologia de fibroblastos bovinos após 24 horas de cultura *in vitro*. Citograma bidimensional em *dot plot* de SSC (escala logarítmica) X FSC (escala linear).

A avaliação morfológica das células expostas aos NMs é importante, uma vez que o desarranjo celular está associado aos processos de morte por necrose ou apoptose. No presente estudo, as alterações de SSC e FSC foram mais evidentes em fibroblastos expostos a maiores concentrações de NFCs e MWCNT-COOHs quando comparados a menores concentrações ou ao controle (Fig. 19 e 20), possivelmente por maior adsorção desses NMs à membrana plasmática ou seu acúmulo no citoplasma. Esses resultados são coerentes com os encontrados nos ensaios de viabilidade celular que demonstraram citotoxicidade de NFCs e MWCNT-COOH em altas concentrações. A avaliação complementar desses parâmetros citométricos é importante, pois indica alterações da morfologia e tamanho celular decorrentes de efeitos tóxicos dose dependentes dos MWCNT-COOHs e das NFCs em fibroblastos bovinos cultivados *in vitro*.

5.2 EXPERIMENTO 2 - EMBRIOTOXICIDADE DE NFC E MWCNT-COOH EM EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO*

5.2.1 Efeito dos nanomateriais no desenvolvimento embrionário

Não houve diferença nas taxas de eclosão ($P=0,24$) e de degeneração ($P=0,17$) nos embriões expostos às NFCs ou aos MWCNT-COOHs na concentração de $0,2 \mu\text{g ml}^{-1}$ após 72 h de contato (Tab. 2). O período embrionário pré-implantacional é caracterizado por distintas fases de alterações morfológicas que incluem a clivagem, a compactação, a expansão e a eclosão. Destas, a eclosão é um evento crítico no desenvolvimento e está relacionada a capacidade de sobrevivência embrionária (TRIGAL et al., 2013).

Por outro lado, as taxas de degeneração refletem alterações no desenvolvimento que resultaram em parada dos ciclos de divisão celular (MA, YANG e LIANG, 2012) e posterior morte das células. Assim, a avaliação desses parâmetros é importante para os estudos da influência de NMs no desenvolvimento e sobrevivência embrionária.

Tabela 2 – Taxa de eclosão e degeneração de embriões bovinos cultivados *in vitro* expostos a $0,2 \mu\text{g ml}^{-1}$ de NFC ou MWCNT-COOH por 72 horas.

N	Grupos	Eclosão* (%)	Degeneração* (%)
43	Controle	$60,76 \pm 5,81$	$5,15 \pm 3,38$
41	NFC	$53,90 \pm 4,47$	$4,22 \pm 2,59$
46	MWCNT-COOH	$57,08 \pm 2,24$	$5,82 \pm 3,96$

*Teste Qui-quadrado. Não houve diferença nas taxas de eclosão ($P=0,24$) e degeneração ($P=0,17$) entre os grupos. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média.

As NFCs e os MWCNT-COOHs possuem grande potencial de aplicação, desde a indústria até a biomedicina. Porém, os riscos da exposição materna durante o período embrionário são poucos compreendidos para os NTCs ou desconhecidos no caso das NFCs. No que tange o estudo da toxicidade de NTCs em embriões, algumas informações foram produzidas em espécies aquáticas como os peixes-zebra (CHENG, FLAHAUT e CHENG, 2007; CHENG et al., 2009) e poucos ensaios foram realizados em mamíferos (LIM et al., 2011; PIETROIUSTI et al., 2011; ZALGEVIČIENĖ et al., 2012).

Embriões bovinos são bons modelos de toxicidade para testes de agentes potencialmente teratogênicos, pois são sensíveis a toxicantes, bem como pelas suas similaridades morfológicas e bioquímicas a embriões humanos (CAMARGO et al., 2006; BAUMANN et al., 2007; LEIDENFROST et al., 2011).

Vale ressaltar que pouco se conhece sobre os possíveis efeitos da exposição de embriões mamíferos no período inicial de desenvolvimento (pré-implantacional) aos MWCNTs. Com relação às NFCs, ainda não são conhecidos seus efeitos em nenhuma fase do desenvolvimento embrionário de mamíferos. Dentre os períodos críticos de desenvolvimento de um organismo destaca-se a fase pré-implantacional, possivelmente devido a existência de células ainda indiferenciadas. Um distúrbio nesta etapa pode causar falhas na implantação ou levar a danos nos processos de divisão celular e diferenciação que originarão os tecidos fetais (ZALGEVIČIENĖ et al., 2012).

No presente estudo, as NFCs e os MWCNT-COOHs não alteraram as taxas de eclosão e degeneração. Porém, trabalhos utilizando outro tipo de NTC (SWCNTs), em concentrações mais elevadas ($30 \mu\text{g ml}^{-1}$) e em fase pós-eclosão embrionária, demonstraram malformações fetais e aumento na produção de EROs em camundongos (PIETROIUSTI et al., 2011). Lesões nas células embrionárias acarretam em maior proporção de embriões não eclodidos ou degenerados (LEIDENFROST et al., 2011). Desta forma, a manutenção destas taxas no presente trabalho sugere que as NFCs e os MWCNT-COOHs, nas condições testadas, não influenciaram a cinética de desenvolvimento e a sobrevivência de embriões bovinos produzidos *in vitro*.

5.2.2 Expressão gênica

Para uma melhor compreensão de possíveis alterações moleculares causadas pela exposição embrionária às NFCs e aos MWCNT-COOH foi estudada a expressão de genes relacionados a manutenção da pluripotência e regulação da diferenciação celular (OCT4 e HDAC1), além de genes envolvidos com a resposta ao estresse (PRDX1 e HSP70.1) e indução da apoptose (BAX).

As análises de expressão gênica revelaram que o contato dos NMs, em especial os MWCNT-COOHs com os embriões sobre-regularam a abundância de todos os transcritos avaliados: OCT4 ($1,30 \pm 0,40$; $P=0,04$), HDAC1 ($1,39 \pm 0,45$; $P= 0,04$), PRDX1 ($1,30 \pm 0,46$; $P= 0,02$), HSP70 ($1,85 \pm 0,60$; $P= 0,03$) e BAX ($1,66 \pm 0,57$; $P=0,002$) (Fig. 21). Por outro

lado, em embriões expostos a $0,2 \mu\text{g ml}^{-1}$ de NFC, apenas o gene OCT4 ($0,67 \pm 0,22$) foi sub-regulado ($P=0,006$; Fig. 21). Os genes HDAC1, PRDX1, BAX e HSP70.1 não tiveram a expressão gênica alterada nesse grupo ($P=0,795$; Fig. 21).

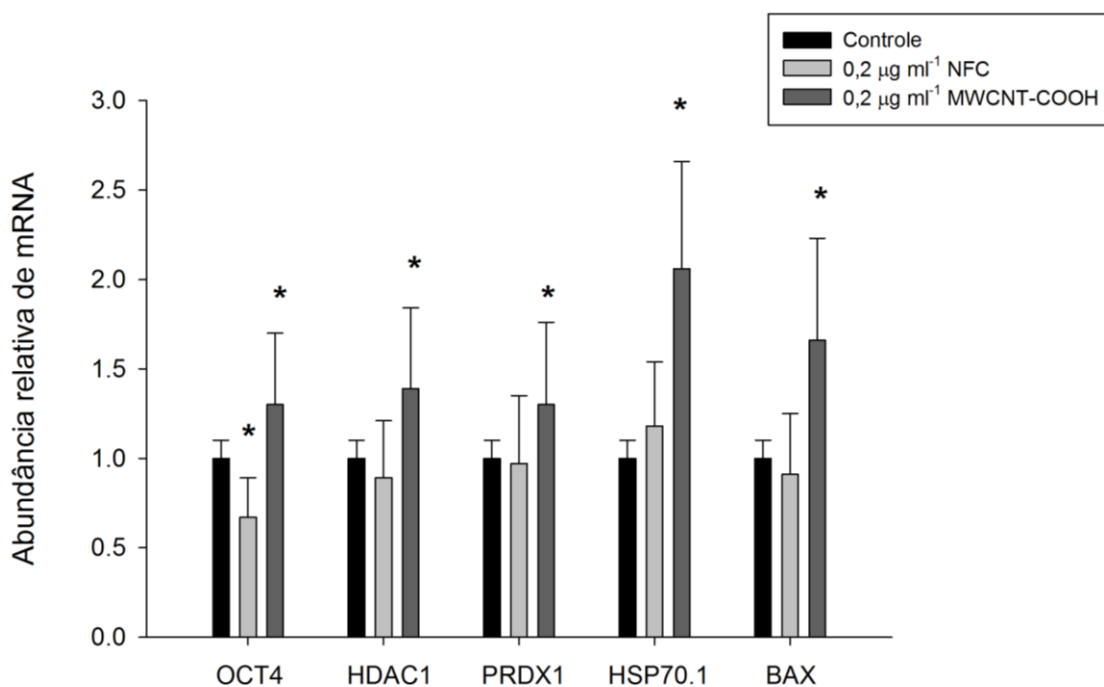


Figura 21. Expressão relativa (média \pm EP) dos transcritos para *Octamer-binding transcription factor 4* (OCT4), Histona deacetilase 1 (HDAC1) Peroxiredoxina 1 (PRDX1), *Heat shock protein 70.1* (HSP70.1) e *B cell leukemia 2 associated X protein* (BAX) em embriões bovinos cultivados sem nanomateriais (grupo controle) e com $0,2 \mu\text{g ml}^{-1}$ de NFCs ou MWCNT-COOHs após 72 horas. A expressão dos grupos expostos aos nanomateriais foram comparadas com o grupo controle (expressão relativa = 1,00). * $P < 0,05$.

Até o momento, várias pesquisas vêm sendo realizadas para a melhor compreensão dos mecanismos pelos quais os NTCs causam toxicidade em células. Os efeitos citotóxicos mais comuns envolvem o estresse oxidativo (DOSHI e MITRAGOTRI, 2010), danos a organelas ou à membrana plasmática. Essas lesões são devido à ação física dos NTCs atribuídas a sua forma semelhante a “agulha” que perfura e danifica as estruturas celulares (KOSTARELOS, 2008). Em conjunto, a forma, tamanho e composição química são componentes determinantes na toxicidade desses NMs (KOSTARELOS, 2008; DOSHI e MITRAGOTRI, 2010; YAMASHITA et al., 2010) e podem estar relacionados às alterações de expressão gênica observadas no presente estudo.

O gene OCT4, também conhecido como POU5F1 expressa um fator de transcrição importante durante a embriogênese. A expressão deste gene já foi observada em embriões de humanos (NIAKAN e EGGAN, 2013), camundongos (FRUM et al., 2013) e bovinos, (PANT e KEEFER, 2009). A função mais bem conhecida de OCT4 é a manutenção da pluripotência mediante inibição de vias essenciais para o desenvolvimento. Este gene fica ativo no início da embriogênese quando as células embrionárias ainda estão em um estado bastante indiferenciado. Posteriormente, ocorre a sub-regulação gradual de OCT4 considerado um processo natural durante a formação da blastocela e diferenciação (KIRCHHOF et al., 2000; MITSUI et al., 2003). Contudo, a diminuição desses transcritos precocemente pode alterar a diferenciação embrionária, uma vez que as proteínas de OCT4 são encontradas em estágios posteriores de desenvolvimento como, por exemplo nas células do hipoblasto e epiblasto (KIRCHHOF et al., 2000). O hipoblasto e epiblasto são linhagens celulares provenientes do embrioblasto e originarão o saco vitelínico e os folhetos embrionários (ectoderma, endoderma e mesoderma), respectivamente.

Por outro lado, a sobre-regulação de OCT4 pode manter as células embrionárias no estágio indiferenciado por um tempo maior do que ocorre normalmente. Ambas as condições podem levar a falhas de diferenciação celular. Estudos recentes demonstraram que a correta expressão de OCT4 é fundamental para a expressão subsequente de múltiplos genes que controlam o desenvolvimento do epiblasto e do endoderma primitivo (FRUM et al., 2013). Os NMs estudados no presente estudo causaram efeitos antagônicos na expressão deste gene em blastocitos bovinos. As NFCs induziram a diminuição da expressão de OCT4, enquanto os MWCNT-COOH causaram o aumento dos transcritos para esse gene. Recentemente, Halder et al. (2013) observaram que a exposição de células embrionárias humanas a agentes teratogênicos como o etanol induziu a sub-regulação de OCT4. Assim, a expressão deste gene pode ser influenciada por substâncias potencialmente teratogênicas que entram em contato com os embriões.

As proteínas HDAC1 atuam em um dos principais mecanismos de regulação epigenética dos genes, promovendo a deacetilação de histonas. As histonas são proteínas nucleares associadas às moléculas de DNA que, dependendo de sua conformação determina a densidade de compactação da cromatina. A deacetilação de histona promove a condensação da cromatina e repressão da expressão gênica por deixar inacessíveis os sítios de ligação de fatores de transcrição. No período pré-implantacional a HDAC1 desempenha importante papel na repressão gênica regulando a correta diferenciação celular (WANG et al., 2011). Em

embriões de *Xenopus*, a inativação deste gene foi diretamente correlacionada às más formações congênitas (CARNEIRO et al., 2011). Em embriões de camundongos, proteínas de HDAC1 ligam-se, principalmente, a genes ativos nas células tronco embrionárias e trofoblásticas (KIDDER e PALMER, 2011). Portanto, a sobre-regulação deste gene nos embriões expostos aos MWCNT-COOHs podem ter potencial impacto no desenvolvimento embrionário. Essa hipótese é reforçada por trabalhos anteriores que relacionaram altos níveis de HDAC com alterada expressão gênica e falha na diferenciação celular (CRESS e SETO, 2000). Porém, mais estudos são necessários para o entendimento das consequências da desregulação de genes atuantes na manutenção da pluripotência embrionária (OCT4) e regulação epigenética (HDAC1) promovidas pela exposição a NMs.

PRDX1 é um membro da família de proteínas antioxidantes PRDX envolvidas na regulação do redox celular. Em condições fisiológicas adversas, como o aumento de produção de EROs, as células normalmente sobre-regulam a expressão desse gene (ISHII et al., 2000; LI et al., 2002). Estudos anteriores demonstraram que condições de estresse oxidativo causaram um aumento nos níveis de PRDX1 em embriões cultivados *in vitro* (PEREIRA et al., 2010a). Neste trabalho, o gene de PRDX1 foi sobre-regulado nos embriões expostos aos MWCNT-COOHs. O estresse oxidativo tem sido apontado como o principal mecanismo de citotoxicidade exercido por NTC (JIA et al., 2005; YE et al., 2009; DI GIORGIO et al., 2011). A indução da produção de EROs pelos NMs é geralmente atribuída a grande área de superfície de materiais na escala “nano” (PUJALTE et al., 2011). Portanto, a atividade biológica dos MWCNT-COOHs devido a sua grande área de superfície pode ter gerado um alto potencial pro-oxidante nos embriões utilizados no presente estudo. Provavelmente, a sobre-regulação de PRDX1 pode representar uma resposta celular dos embriões para minimizar o estresse oxidativo. Em pacientes humanos expostos a fibras de asbestos (semelhantes morfológicamente aos MWCNT-COOH) foram identificados altos níveis plasmáticos de proteínas de PRDX1 (ROSTILA et al., 2012). Esses mesmos autores sugerem que PRDX1 pode ser utilizado como biomarcador de exposição a essas fibras. De forma semelhante, a expressão de PRDX1 parece ser um indicador de estresse oxidativo em células expostas a NMs.

A expressão do gene HSP70 é um importante biomarcador de dano celular. As HSP70s agem como chaperonas moleculares na remodelagem de proteínas alteradas pelo estresse e protegendo a homeostase celular (CICCHETTI et al., 2011). Em condições fisiológicas normais essas proteínas são expressas em baixos níveis. Porém, estímulos como a

produção de EROs, alterações de temperatura, metais pesados ou outros estresses ambientais podem aumentar os níveis intracelulares de HSPs (XIAO et al., 2002). Trabalhos anteriores verificaram que em determinadas condições, os NMs podem estimular a expressão de HSP70 (CICCHETTI et al., 2011; HU et al., 2011), particularmente devido ao estresse celular induzido pelos agregados ou aglomerados de NMs (OKUDA-SHIMAZAKI et al., 2010). Como discutido no experimento 1, a formação de agregados parece ser um fator importante que influencia na toxicidade de NFCs e MWCNT-COOHs. Dados deste segundo experimento estão de acordo com esses achados, uma vez que em embriões cultivados em meio contendo MWCNT-COOH também foram observados a formação de agregados (Fig. 22), e o aumento na expressão de genes relacionados ao estresse ou apoptose (Fig. 21).

Por outro lado, em estudos prévios com as NFCs a agregação foi relacionada a menores efeitos tóxicos (LIMA et al., 2012). De fato, a expressão de HSP70.1, PRDX1 e BAX não foi alterada em embriões expostos às NFCs. Assim, a agregação pode desencadear diferentes respostas tóxicas que podem ser influenciadas pelo tipo de NM, bem como pelo modelo biológico estudado.



Figura 22. Fotomicrografias de embriões bovinos expostos a diferentes nanomateriais por 72 horas. **A:** controle, **B:** $0,2 \mu\text{g ml}^{-1}$ de NFC e **C:** $0,2 \mu\text{g ml}^{-1}$ MWCNT-COOH. A seta destaca a formação de agregados de MWCNT-COOH. Aumento de 40x.

Uma das consequências do estresse oxidativo estimulado por NMs é a morte celular por apoptose (RAMKUMAR et al., 2012). Em células endoteliais de ratos expostas aos SWCNTs foi verificada alta produção de EROs que induziram o processo apoptótico (CHENG et al., 2011). No presente estudo, a abundância de transcritos para BAX foi aumentada em embriões expostos aos MWCNT-COOHs. O gene BAX expressa uma proteína pró-apoptótica que induz a morte celular em resposta a estímulos apoptóticos (VAN DELFT e HUANG, 2006). De forma semelhante, MWCNTs aumentaram os níveis de BAX em células pulmonares de ratos (RAVICHANDRAN et al., 2010). A mesma resposta celular ocorreu

após a exposição de células de fígado humanas a nanopartículas de dióxido de titânio (YOO et al., 2008) e células pulmonares A549 à nanopartículas de pratas (LEE et al., 2011). Portanto, a sobre-regulação de BAX parece ser um evento frequente quando as células são expostas a alguns tipos de NMs. Para compreender melhor os possíveis efeitos da interação das NFCs e dos MWCNT-COOHs na qualidade embrionária e propensão a apoptose, foram realizados estudos de apoptose *in situ* utilizando a técnica de TUNEL e os resultados serão discutidos a seguir.

5.2.3 Número total de células e índice apoptótico

Após a exposição dos embriões às NFCs e aos MWCNT-COOHs por 72 h não foram observadas diferenças no número total de células ($P=0,91$), número de células apoptóticas ($P=0,89$) ou índice apoptótico ($P=0,82$) quando comparado ao controle (Tabela 3).

Tabela 3 – Efeito das NFCs e dos MWCNT-COOHs ($0,2 \mu\text{g ml}^{-1}$) após 72 horas de exposição no número total de células e apoptose em embriões produzidos *in vitro*

Grupos	N	Total de células*	Células Apoptóticas*	Índice apoptótico* (%)
Controle	19	130,88±5,59	13,22±1,05	10,28±2,83
NFC	16	126,06±6,93	14,43±1,62	11,46±3,57
MWCNT	16	127,81±8,04	14,37±1,99	10,28±1,51

*ANOVA. Não houve diferença no número total de células ($P=0,91$), número de células apoptóticas ($P=0,89$) e índice apoptótico ($P=0,82$) entre os grupos. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média.

Na Figura 23 estão representadas as imagens dos blastocistos submetidos à técnica de TUNEL após contato com os NMs.

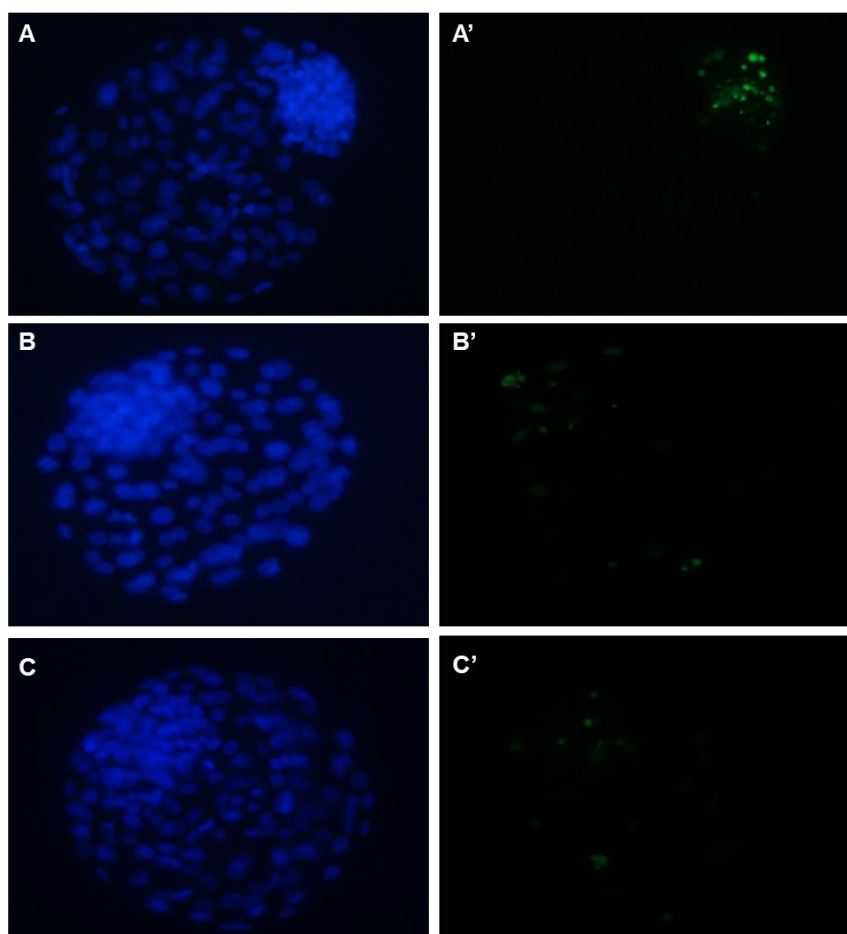


Figura 23. Detecção da fragmentação do DNA pela técnica de TUNEL em blastocistos bovinos cultivados por 72 horas sem nanomateriais e com NFCs ou MWCNT-COOHs. Ilustrações **A**, **B** e **C** - Blastocistos com blastômeros marcados pelo DAPI e visualizados em azul (460nm). Ilustrações **A'**, **B'** e **C'** - Blastocistos com blastômeros corados pela fluoresceína e visualizados em verde ($520\pm 20\text{nm}$), indicando apoptose. Grupos - **A/A'** (grupo controle); **B/B'** ($0,2 \mu\text{g ml}^{-1}$ NFC); **C/C'** ($0,2 \mu\text{g ml}^{-1}$ MWCNT-COOH) - Aumento: 100X.

A avaliação de TUNEL se baseia na utilização da enzima terminal deoxinucleotidil transferase TdT, que promove a ligação de nucleotídeos marcados com fluoresceína na região livre 3'OH das quebras do DNA (KYRYLKOVA et al., 2012) indicando a degradação do DNA. Nesta técnica o número total de células também pode ser quantificado, pois todos os núcleos são corados em azul pelo corante DAPI. Mediante a quantificação do número total de células e da relação de número de blastômeros intactos com os danificados e o índice apoptótico, é possível avaliar a qualidade do desenvolvimento embrionário (NEUBER et al., 2002; PEREIRA et al., 2010a). O processo de morte celular em embriões tem a função de eliminar células com alterações que são produzidas durante os ciclos celulares (clivagens) que promovem o aumento do número de blastômeros. A apoptose pode ocorrer pelo estresse

provocado pelo sistema de cultura *in vitro*, porém, normalmente, acomete os embriões em baixas taxas, sendo considerada um processo normal de desenvolvimento. Por isso, tanto embriões produzidos *in vivo* quanto *in vitro* apresentam blastômeros em processo de morte (HARDY, 1997) e a proporção de células nessa condição pode atingir valores aproximados de 20% dentro de um mesmo embrião (NEUBER et al., 2002; PEREIRA et al., 2010a). No presente estudo, os índices apoptóticos dos embriões não ultrapassaram os valores encontrados na literatura tanto no grupo controle ($10,28 \pm 2,83$) quanto naqueles expostos às NFCs ($11,46 \pm 3,57$) ou aos MWCNT-COOHs ($10,28 \pm 1,51$).

Zhu et al. (2007) observaram que $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ MWCNT não lesionaram o DNA de células tronco embrionárias de camundongos. Neste caso, além de terem sido utilizados concentrações superiores ao presente estudo, as células embrionárias ficaram em contato direto com os MWCNTs. Neste trabalho, foi avaliada uma concentração menor ($0,2 \mu\text{g ml}^{-1}$) e as células embrionárias estavam protegidas pela zona pelúcida. Esta estrutura é uma espessa camada formada por glicoproteínas ($10,5 \mu\text{m}$) e tem a função de proteger o oócito e o embrião contra injúrias químicas ou físicas (JOVINE et al., 2005; GUPTA et al., 2009). Apesar dos MWCNTs terem a capacidade de passarem pela zona pelúcida e entrarem em contato com as células embrionárias de bovinos (PEREIRA et al., 2010b), esse contato parece ser minimizado pela presença dessa barreira biológica. Por outro lado, estudos anteriores em bovinos observaram aumento na apoptose em embriões expostos aos MWCNTs na mesma concentração e tempo de exposição ($0,2 \mu\text{g ml}^{-1}$ por 72 h) utilizada no presente trabalho (PEREIRA et al., 2010c). Contudo, neste estudo anterior, a indução da apoptose foi atribuída principalmente a impurezas contidas nos NTCs que após processo de síntese apresentaram baixa pureza (81%). No presente trabalho foram utilizados MWCNT de alta pureza (93%). Portanto, esses achados controversos podem ser explicados principalmente pela natureza química dos diferentes NTCs. Donaldson et al. (2006) e Doshi e Mitragotri (2010) relataram que as impurezas nas amostras de NTCs como metais, ou carbono amorfo é um fator determinante na toxicidade desses materiais. Outro aspecto que influi na toxicidade é a modificação química da superfície dos NMs. Os MWCNTs que entraram em contato com os embriões no presente trabalho são carboxilados. A funcionalização facilita a interação dos NTC com moléculas orgânicas e biológicas aumentando sua biocompatibilidade (PANTAROTTO et al., 2004; JAGADEESAN e ESWARAMOORTHY, 2010). Estudos anteriores demonstraram que a funcionalização de NTCs resultou em menor citotoxicidade desse NM a células cultivadas *in vitro* (DUMORTIER et al., 2006; SAYES et al., 2006). Em

particular, a carboxilação dos NTCs parece ter influência positiva na sua biocompatibilidade (MENG et al., 2013).

Com relação às NFC, este material não causou impacto em nenhum dos critérios de qualidade embrionária avaliados, desde o morfológico até o molecular. Estudos envolvendo a citotoxicidade desse NM são escassos para células e inexistentes para embriões. Nas condições experimentais deste estudo, as NFCs foram mais biocompatíveis em embriões bovinos quando comparados aos MWCNT-COOH. Possivelmente, o caráter biodegradável, a flexibilidade e a constituição química das NFCs (KOLAKOVIC et al., 2011) parecem ser determinantes nas respostas dos organismos que entram em contato com esse NM.

Em resumo, os únicos parâmetros modificados pela exposição de embriões bovinos as NFCs e aos MWCNT-COOHs foram os de expressão gênica. Os resultados da PCR em tempo real demonstraram que os MWCNT-COOHs alteraram de forma mais acentuada a abundância de transcritos importantes para a homeostase e desenvolvimento embrionário quando comparados às NFCs. Por outro lado, as NFCs e os MWCNT-COOHs não alteraram a cinética de desenvolvimento e sobrevivência embrionária. Dados do ensaio de TUNEL reforçaram esses achados. Os blastocitos expostos aos NMs não tiveram mudança em outros indicadores de viabilidade, como o número total de células e a apoptose.

Esses resultados são relevantes, pois existe uma grande carência de informações sobre o potencial embriotóxico de novos materiais como as NFCs e os MWCNT-COOHs em modelos mamíferos que são utilizados em estudos para melhorar a saúde humana. Em adição, esses dados abrem possibilidades para que os MWCNT-COOHs sejam candidatos a transferirem ácidos nucleicos ou moléculas terapêuticas para o interior de embriões.

5.3 EXPERIMENTO 3 - IMPACTOS DE MWCNT E NFC NAS MICROALGAS *CHLORELLA VULGARIS* E *KLEBSORMIDIUM FLACCIDUM*

5.3.1 Análise por difração de raio X

Na Figura 24 estão demonstrados os padrões de DRX que indicam que os NMs apresentam estrutura pura e características dos MWCNT (BUSSY et al., 2012) e das NFC (TEIXEIRA et al., 2010).

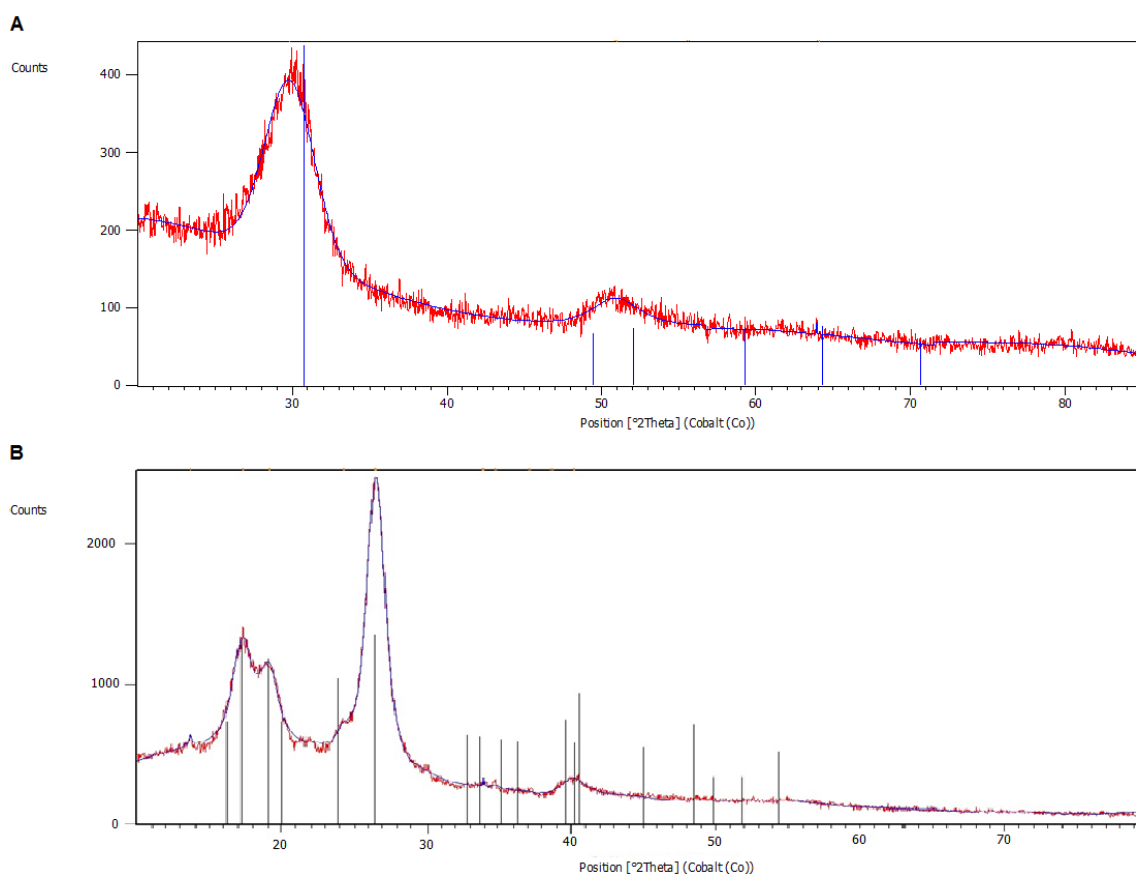


Figura 24. Difractogramas de raio X de MWCNT (A) e NFC (B).

5.3.2 Potencial Zeta (PZ)

Uma das primeiras etapas para estudar a rota de exposição aquática de NMs consiste em investigar o comportamento de novas estruturas na água. Assim, o monitoramento da evolução da carga de superfície das microalgas na presença de MWCNT ou de NFC em meio BB ou água do Rio Sena foi realizado por PZ. O comportamento do PZ desses NMs em pH

neutro, ácido ou básico estão demonstrados nas Figuras 25-27. Os resultados revelaram que os valores de PZ da solução contendo NMs e *C. vulgaris* foram afetados pelo tipo de meio de cultura.

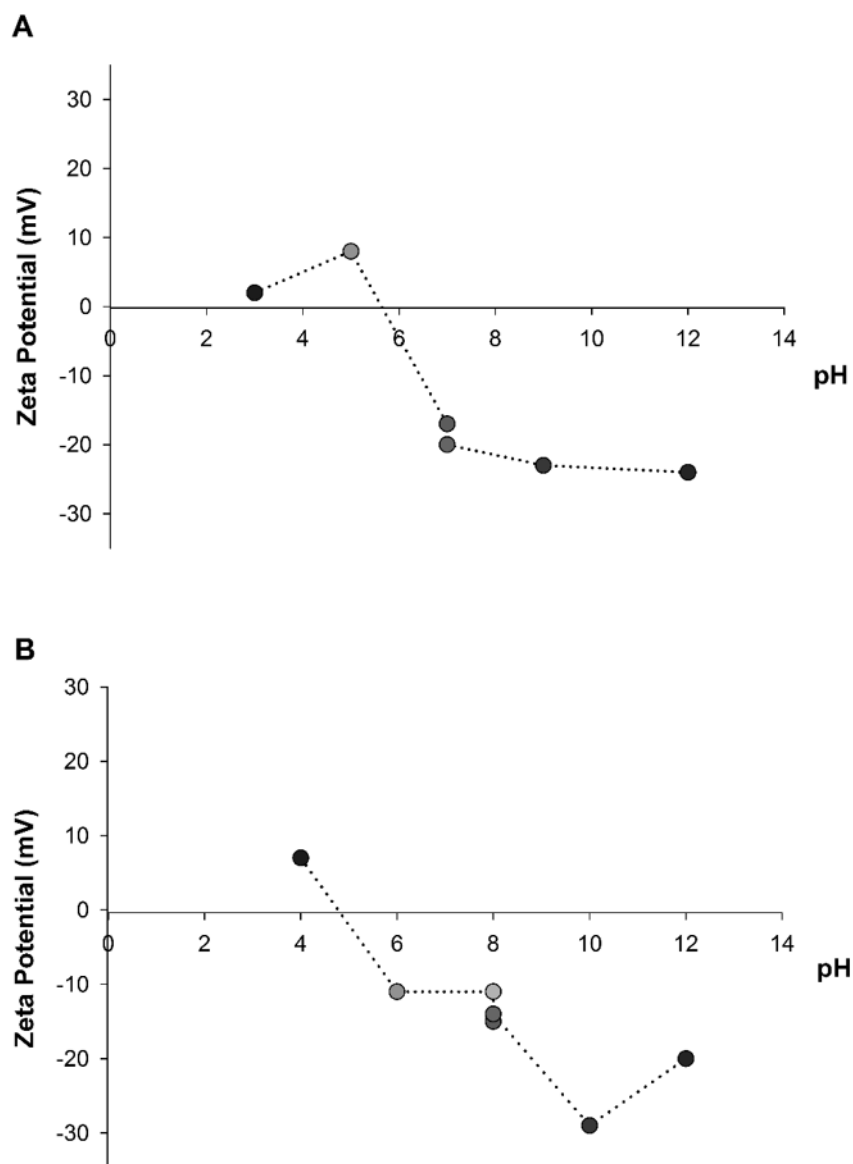


Figura 25. Variação do Potencial Zeta na solução de *C. vulgaris* expostas a MWCNTs em meio de cultura BB ou água do Rio Sena em diferentes pHs após 48 horas. **A.** meio de cultura BB, **B.** Água do Rio Sena. Dados apresentados pela média.

Em *C. vulgaris* cultivadas em meio BB (pH 7,0), o PZ foi de $-17 \pm 0,7$ mV. A adição de MWCNT não causou mudança no PZ ($-17 \pm 1,15$ mV) da solução contendo as células em meio BB (Fig. 25A). Porém, o PZ foi alterado em *C. vulgaris* cultivadas em água do Rio Sena (-11

$\pm 1,13$ mV) após a exposição aos MWCNTs ($-15 \pm 1,05$ mV) (Fig. 25B). Este comportamento pode ser explicado pela forte força iônica do meio BB. A alteração do PZ de $-17 \pm 0,7$ mV para $-14 \pm 1,27$ mV foi observado quando as NFCs foram adicionadas na solução de *C. vulgaris* em meio BB, enquanto em água do Rio Sena, as NFCs induziram mudanças para $-11 \pm 1,25$ mV (Fig. 26A, B).

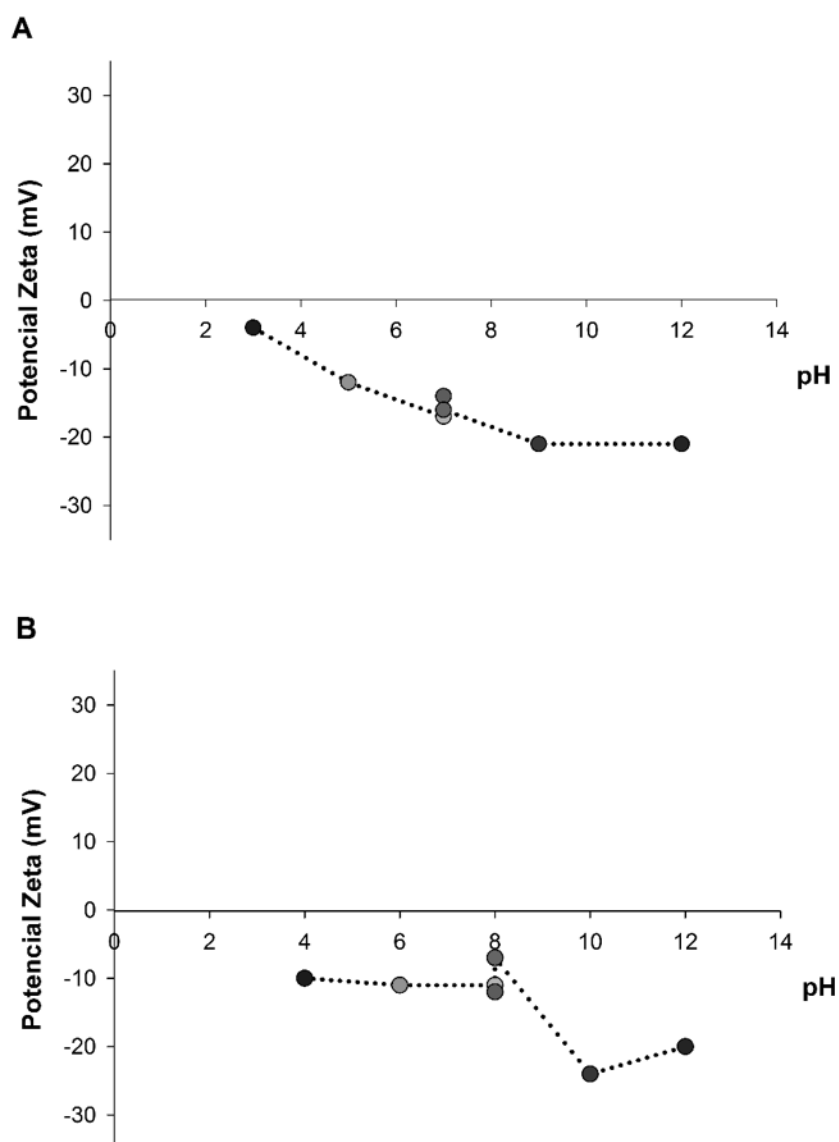


Figura 26. Variação do Potencial Zeta na solução de *C. vulgaris* expostas a NFC em meio de cultura BB ou água do Rio Sena em diferentes pHs após 48 horas. **A.** meio de cultura BB, **B.** Água do Rio Sena. Dados apresentados pela média.

Nas microalgas *K. flaccidum* cultivadas em meio BB, o PZ foi alterado após adição de NFC de $-19 \pm 1,05$ mV para $-16 \pm 1,33$ mV (Fig. 27). Quando os MWCNT foram adicionados

o PZ foi de $-20,86 \pm 2,33$ mV. Não foram realizadas análises do PZ de *K. flaccidum* em água do Rio Sena, pois essas microalgas não cresceram nestas condições de cultura.

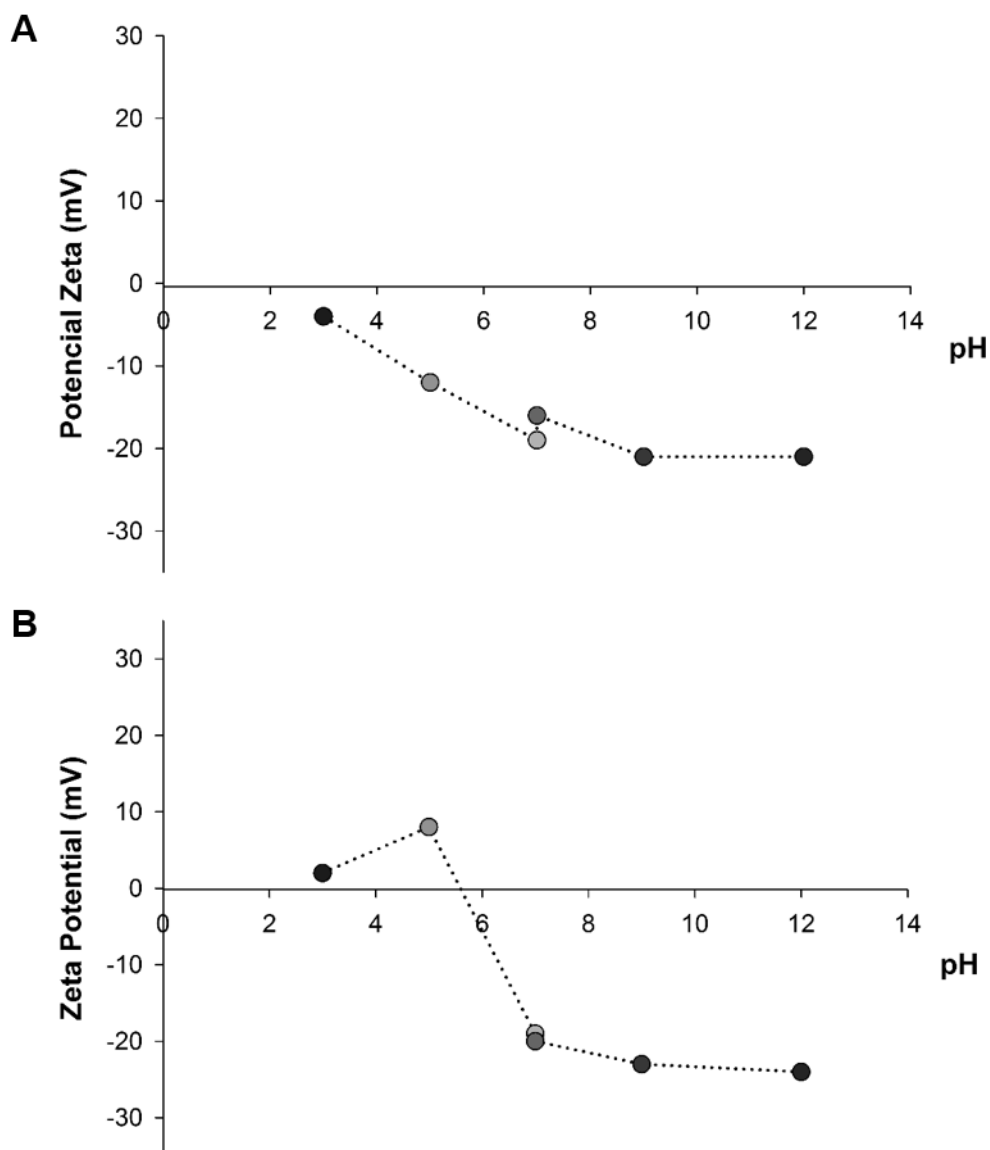


Figura 27. Variação do Potencial Zeta na solução de *K. flaccidum* expostas a MWCNT (A) e NFC (B) em meio de cultura BB em diferentes pHs após 48 horas. Dados apresentados pela média.

Os PZs em microalgas *C. vulgaris* cultivadas em meio BB e água do Rio Sena foram $-17 \pm 0,7$ mV e $-11 \pm 1,13$ mV, respectivamente. No caso de *K. flaccidum* o PZ em meio BB foi de $-19 \pm 1,05$ mV. Esses resultados sugerem que existem poucos sítios catiônicos nas microalgas para a adsorção de NMs carregados negativamente. NMs carregados positivamente possuem maior capacidade de permeação celular que NMs carregadas

negativamente, devido à repulsão eletrostática da membrana plasmática. Entretanto, NMs aniônicos podem ligar-se a superfície celular na forma de *clusters* devido a interações repulsivas entre grandes domínios carregados negativamente da superfície celular (WILHELM et al., 2003). Similarmente, Patil et al. (2007) demonstraram a entrada de NMs carregados negativamente em células, devido a processos não específicos de adsorção de NMs em sítios carregados positivamente presentes na membrana celular.

Em pH ácido o PZ de MWCNT em meio BB e água do Rio Sena foram positivos, mas em pH básico o PZ foram negativos. Assim, possivelmente condições de pH ácido podem aumentar a interação de NMs com sistemas biológicos. Por outro lado, a adição de NFC tanto em meio básico ou ácido revelaram PZ negativos. Estudos anteriores demonstraram que a dispersão de NTC é influenciada pelo PZ (HEISTER et al., 2010). Portanto, a correlação do PZ e pH é importante para a predição de como a carga de superfície de NMs podem ser alteradas após variações de pH em águas naturais.

5.3.3 Proliferação e viabilidade celular

O efeito de NMs na inibição de crescimento de *C. vulgaris* e *K. flaccidum* foi obtido por contagem celular. A Figura 28 demonstra os efeitos tóxicos dos NMs em *C. vulgaris* cultivadas em meio BB e água do Rio Sena em função de diferentes concentrações e tempo de exposição. Após 24 h de exposição em meio BB (Fig. 28A), o número de células de *C. vulgaris* foi reduzido ($P < 0,0001$). Interessantemente, a exposição de NMs levou a diminuição do número de células de forma não dose-dependente em cultura de *C. vulgaris* e em ambos os NMs a inibição do crescimento destas microalgas ocorreram na concentração de $1 \mu\text{g ml}^{-1}$.

Por outro lado, em água do Rio Sena (Fig. 28B) com 24 h de exposição, somente as microalgas *C. vulgaris* expostas a $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ MWCNT apresentaram diminuição no número celular ($P = 0,022$). Assim, pode-se hipotetizar que substâncias presentes na água do Rio Sena, como polímeros naturais (ácidos fúlvicos e húmicos) (GARNIER, MOUNIER e BENAÏM, 2004), podem ter atenuado os efeitos citotóxicos dos MWCNT até 24 h de exposição, exceto em altas concentrações. Por outro lado, os NMs podem interagir com componentes do meio de cultura, assim, hipoteticamente também pode estar ocorrendo uma restrição de micronutrientes essenciais para o crescimento das *C. vulgaris* no meio de cultura BB. No caso do meio BB sua composição é constante, porém a constituição da água do Rio Sena é mais heterogênea e rica em compostos naturais que podem servir de alternativas metabólicas a

eventuais restrições de micronutrientes. Após 48h, observa-se uma diminuição do número de células em altas concentrações (50 e 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$) em ambos os NMs ($P < 0,05$). Particularmente, maiores períodos de exposição na concentração de 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ MWCNT resultaram em maior impacto no crescimento das microalgas *C. vulgaris* comparado a outros grupos (Fig. 28B).

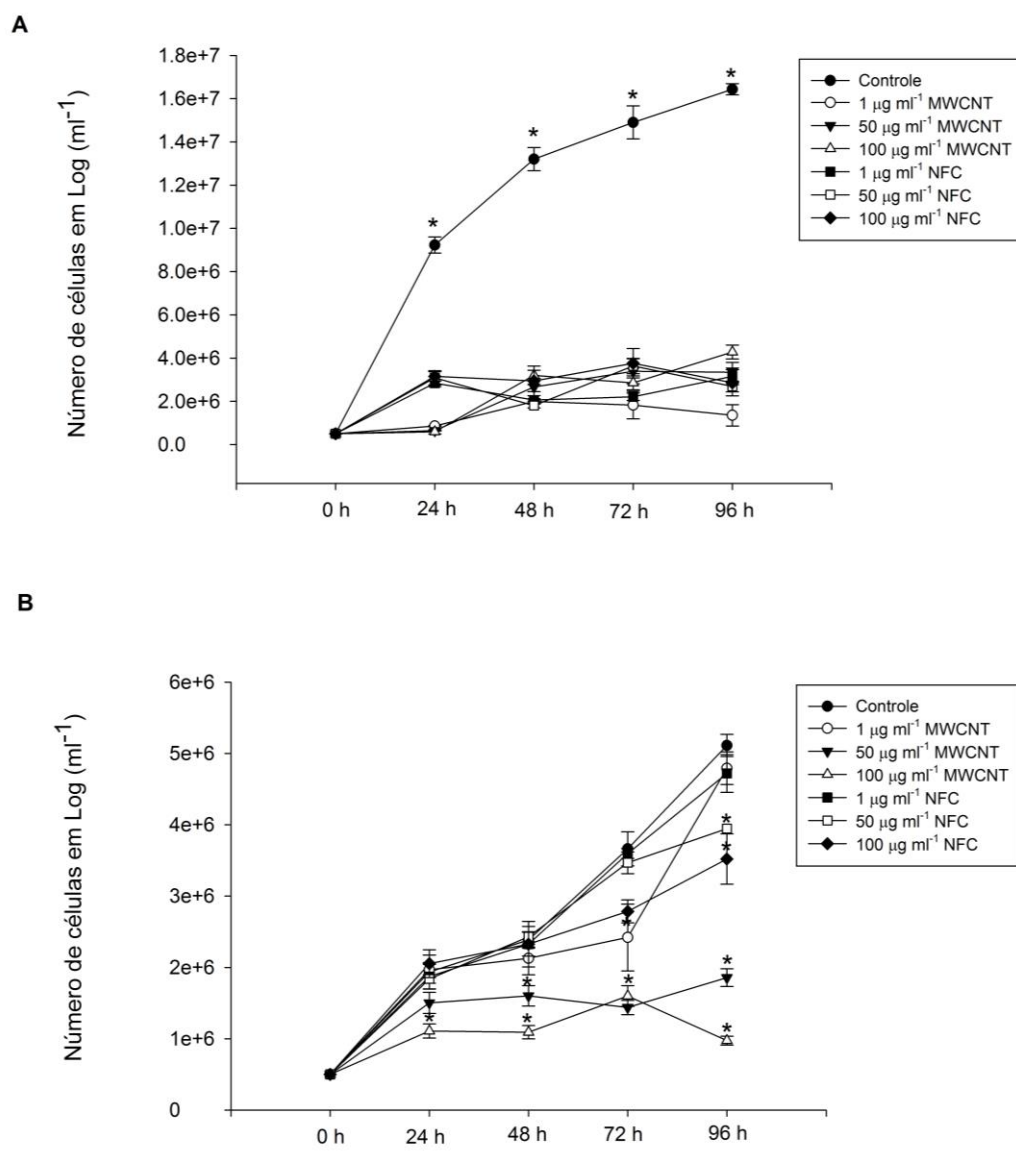


Figura 28. Efeito de NMs no crescimento de *C. vulgaris* em meio de cultura BB (A) ou água do Rio Sena (B). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Diferenças significativas entre os grupos expostos aos nanomateriais (MWCNT ou NFC) e o controle são indicados por * $P < 0,05$.

Nas microalgas filamentosas *K. flaccidum* foi observado o declínio no número celular ($P < 0,002$), principalmente após 48h de exposição aos NMs em meio BB (Fig. 29). As

microalgas *K. flaccidum* não cresceram em água do Rio Sena. Possivelmente, isso ocorreu devido ao fato dessas microalgas serem mais exigentes em termos nutricionais para serem cultivadas *in vitro*. Isso não ocorreu com as microalgas *C. vulgaris* que toleram melhor as condições *in vitro* de cultivo.

Os resultados de alteração no crescimento celular em presença de NMs estão de acordo com prévios estudos, nos quais os NTCs reduziram o crescimento de *C. vulgaris* e outras algas verdes (BLAISE et al., 2008; KWOK et al., 2010; SCHWAB et al., 2011). A utilização de NTC não funcionalizados neste experimento torna-se importante, uma vez que vários outros estudos observaram que a funcionalização pode atenuar os efeitos tóxicos desses materiais. Portanto, a avaliação de MWCNT não funcionalizados pode retratar melhor seu potencial ecotóxico.

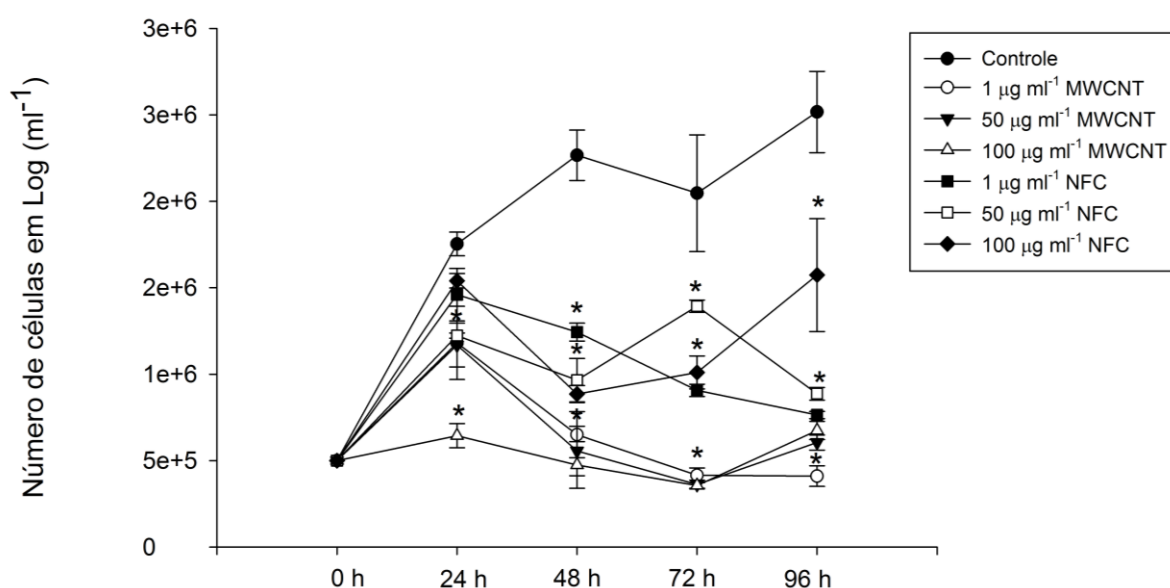


Figura 29. Efeito de NMs no crescimento de *K. flaccidum* em meio de cultura BB. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Diferenças significativas entre os grupos expostos aos nanomateriais (MWCNT ou NFC) e o controle são indicados por * $P < 0,05$.

Um das consequências da exposição celular aos NMs incluem a lise da membrana plasmática que podem ser mensuradas por métodos colorimétricos como ensaios de Azul de Tripan. A exposição das células de *C. vulgaris* aos MWCNTs ou às NFCs levou a significativa redução da viabilidade celular, dependendo da concentração e tempo de exposição (Fig. 30). Em meio BB, os MWCNTs causaram diminuição da viabilidade celular em todas as concentrações testadas (45,50–69,83%; $P = 0,018$) (Fig. 30A). Entretanto, para 1 µg ml⁻¹ (50,50%) e 50 µg ml⁻¹ (48,83%) de NFC a redução da viabilidade ($P = 0,005$) foi

observada somente após 72 h de exposição (Fig. 30A). As células de *C. vulgaris* cultivadas em água do Rio Sena na presença de MWCNT não demonstraram diminuição da viabilidade celular, na concentração de $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ até 72 h de exposição. No entanto, após 96 h foi observada redução na viabilidade ($61,70\%$; $P=0,038$). Em altas concentrações de MWCNTs (50 e $100 \mu\text{g ml}^{-1}$) foram observadas acentuadas diminuições da viabilidade celular ($P<0,001$) com taxas de $55,33\%$ e $33,95\%$, respectivamente (Fig. 30B). Com relação às microalgas *C. vulgaris* expostas às NFCs em água do Rio Sena, foi observada diminuição da viabilidade celular em todas as concentrações testadas, especialmente após 72 h ou 96h de exposição.

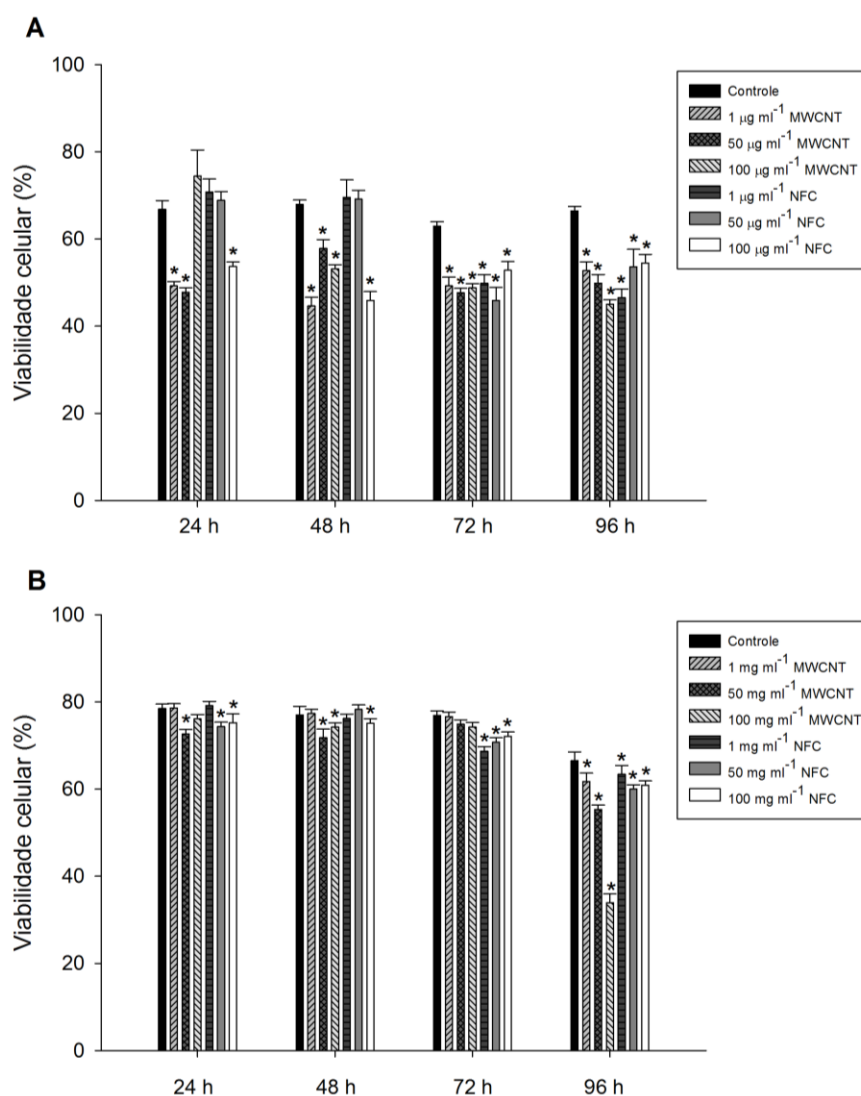


Figura 30. Viabilidade celular de microalgas *C. vulgaris* expostas a diferentes concentrações de MWCNT e NFC (1 , 50 e $100 \mu\text{g ml}^{-1}$) em função do tempo (24, 48, 72 e 96 horas) em meio de cultura BB (A) ou água do Rio Sena (B). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Diferenças significativas entre os grupos expostos aos nanomateriais (MWCNT ou NFC) e o controle são indicados por $*P<0,05$.

Nas microalgas filamentosas *K. flaccidum* as NFCs e os MWCNTs causaram redução da viabilidade em todas as concentrações testadas, variando o tempo de exposição. Os MWCNTs nas concentrações de 1 e 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ reduziram a viabilidade ($P < 0,001$) em todos os tempos testados (Fig. 31). Porém, para as NFCs, apenas a concentração de 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ promoveram efeitos tóxicos em todos os tempos avaliados (49%-24h, 55%-48h, 56%-72h e 61%-96h; $P < 0,05$) (Fig. 31). Esses resultados são consistentes com outros estudos de viabilidade em diferentes tipos celulares expostos aos NTC (SIMON-DECKERS et al., 2009; KWOK et al., 2010; SCHWAB et al., 2011). Trabalhos recentes indicaram a toxicidade de NFC em células de mamíferos e plantas. Clift et al. (2011) observaram baixa citotoxicidade *in vitro* de NFCs em células pulmonares humanas. Resultados do experimento 1 demonstraram que altas concentrações de NFC (2000 e 5000 $\mu\text{g ml}^{-1}$) causaram a diminuição na viabilidade celular de fibroblastos bovinos após 24 h de exposição. Em particular, as NFCs causaram efeitos genotóxicos em células de plantas (LIMA et al., 2012). Assim, esses resultados, em conjunto, sugerem que a homeostase celular não pode ser mantida em altas concentrações de NFCs ou após períodos de exposição de 96h.

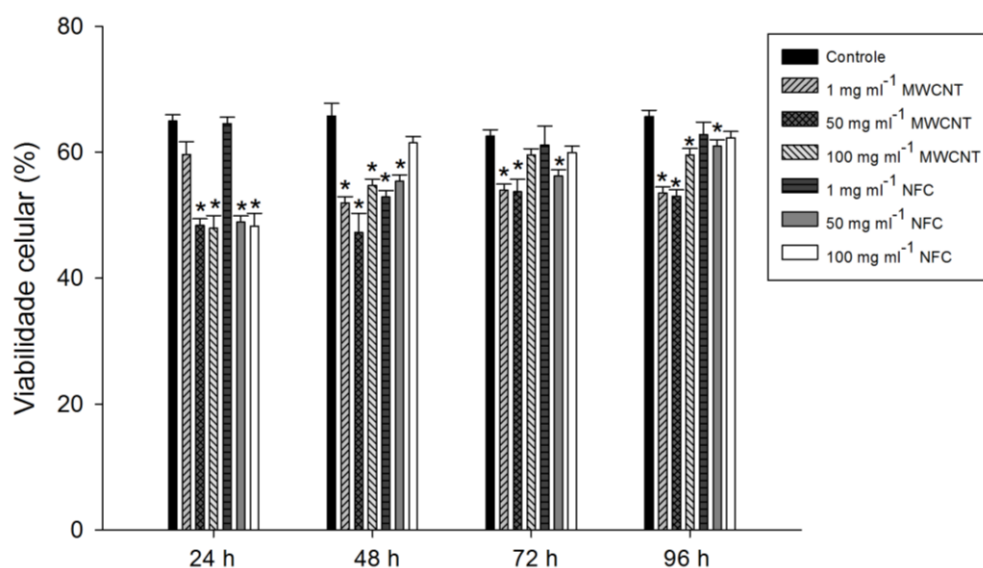


Figura 31. Viabilidade celular de microalgas *K. flaccidum* expostas a diferentes concentrações de MWCNT e NFC (1, 50 e 100 mg mL^{-1}) em função do tempo (24, 48, 72 e 96 horas) em meio de cultura BB. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Diferenças significativas entre os grupos expostos aos nanomateriais (MWCNT ou NFC) e o controle são indicados por * $P < 0,05$.

A microscopia de luz de *C. vulgaris* e *K. flaccidum* expostas aos NMs em alta concentração (100 $\mu\text{g ml}^{-1}$) evidenciou a formação de agregados de células e NMs após 24 h (Fig. 32 e 33). Trabalhos anteriores constataram que a localização de células de microalgas

dentro de aglomerados de NTC levou a diferentes condições de crescimento para esses organismos (SCHWAB et al., 2011). Este fenômeno pode ser explicado pela insuficiente disponibilização de nutrientes que são fundamentais para o crescimento algal (ROGERS et al., 2010; XIN et al., 2010). No presente estudo, possivelmente várias microalgas foram aprisionadas dentro dos agregados de MWCNTs ou de NFCs. Sob essas circunstâncias, as células provavelmente sofreram estresse pela restrição de nutrientes essenciais decorrente do aumento da competição entre as microalgas. Para corroborar esses resultados, Rodea-Palomes et al. (2011) sugeriram que células de *Anabaena* presas dentro de agregados de NMs tiveram o transporte de nutrientes e de metabólitos pela membrana plasmática e parede celular afetado, ocasionando a morte celular.

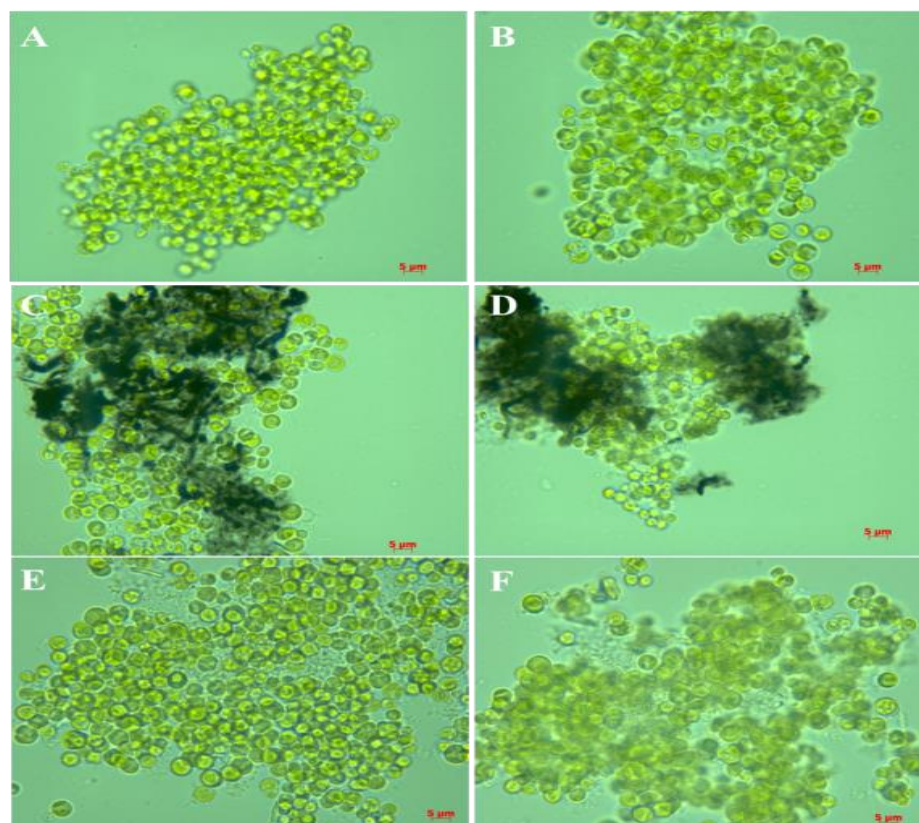


Figura 32. Fotomicrografias de *C. vulgaris* após 24 horas de exposição a $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ MWCNT ou NFC. **A:** Meio de cultura BB; **B:** Água do Rio Sena; **C:** MWCNT em meio BB; **D:** MWCNT em água do Rio Sena; **E:** NFC em meio BB; **F:** NFC em água do Rio Sena. Aumento de 40 x.

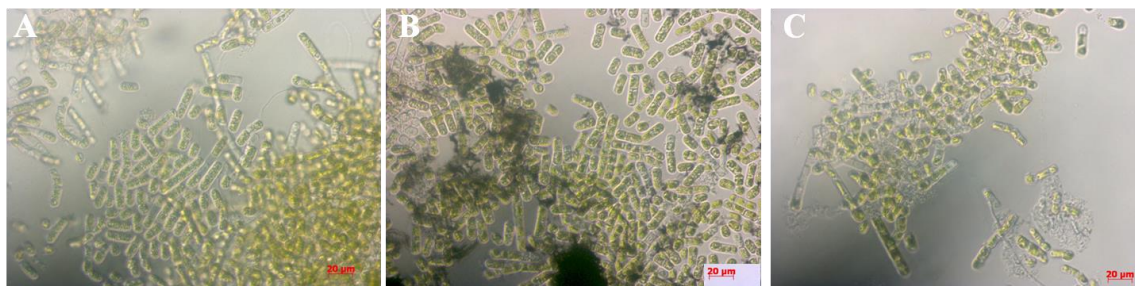


Figura 33. Fotomicrografias de *K. flaccidum* após 24 horas de exposição a $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ MWCNT ou NFC em meio de cultura BB. A: Controle; B: MWCNT; C: NFC. Aumento de 40 x.

A agregação dos NMs depende de vários fatores, tais como a concentração, o pH, o PZ e características do meio aquoso (KELLER et al., 2010; SOHAEBUDDIN et al., 2010). Já está bem estabelecido que os PZs maiores que 30 mV (em módulo) do material particulado, geralmente são considerados estáveis por repulsão eletrostática (JIANG, OBERDÖRSTER e BISWAS, 2009). Assim, o PZ é um fator determinante na estabilidade ou na agregação de NMs em dispersão. Neste trabalho, todos os valores em módulo foram menores que 30 mV, e por isso, propensos a sofrer agregação. Portanto, tanto o meio BB quanto a água do Rio Sena são soluções em que os MWCNTs e as NFCs se comportaram de maneira instável. Em meio de cultura celular, o pH neutro da solução de cultivo (pH 7,4) e a alta força iônica propiciam naturalmente a alta aglomeração de NMs (SIMON-DECKERS et al., 2009). A afinidade das células das microalgas *C. vulgaris* e *K. flaccidum* em interagir com os MWCNTs e as NFCs sugere que existem interações específicas que superam a repulsão eletrostática das cargas negativas desses NMs e das microalgas (observada no PZ).

Dentre os fatores que governam os efeitos de NMs no crescimento das microalgas destacam-se a floculação, a disponibilidade de luz e nutrientes (METZLER et al., 2012). Estudos anteriores revelaram que a inibição da proliferação celular foi correlacionada com o sombreamento causado pelos NTCs e a aglomeração das microalgas (SCHWAB et al., 2011). A alteração da viabilidade celular foi atribuída a formação de agregados em estudos de toxicidade de MWCNTs (SMART et al., 2006; DAVOREN et al., 2007). Clement et al. (2013) demonstraram que agregados de NMs reduziram a fluorescência das microalgas e influenciaram na toxicidade celular. No presente estudo, os resultados dos ensaios de Azul de Tripan e microscopia de luz demonstraram que a formação de agregados de NMs com as microalgas possivelmente afetaram a aquisição de nutrientes essenciais pelas células e diminuiram a viabilidade desses organismos. Todavia, outros mecanismos de toxicidade, como, por exemplo, o efeito “agulha” pode estar envolvido na redução da viabilidade celular.

A inibição do crescimento celular provavelmente ocorreu devido à baixa iluminação e/ou disponibilidade de nutrientes para as microalgas contidas em aglomerados de NMs ou por interferências mecânicas durante a mitose. Assim, esses resultados sugerem um efeito citostático de MWCNTs e NFC na proliferação celular de *C. vulgaris* e *K. flaccidum*.

5.3.4 Eficiência fotossintética

A eficiência fotossintética das microalgas unicelulares *C. vulgaris* e filamentosas *K. flaccidum* após a adição de MWCNT ou NFC foi mensurada utilizando fluorímetro de pulso de amplitude modulada (PAM *fluorometer*) (Fig. 34 e 35). Este método avalia a eficiência quântica potencial (Fv/Fm) do fotossistema II. Valores da razão Fv/Fm refletem o rendimento quântico potencial do fotossistema II e são utilizados como indicadores do desempenho da fotossíntese.

Em meio BB, as concentrações de 1 e 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ MWCNT ou 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ NFC não influenciaram a atividade fotossintética de *C. vulgaris* até 72 h de exposição ($P>0,05$) (Fig. 34A). Entretanto, a atividade fotossintética diminuiu ($0,673\pm 0,03$; $P=0,004$) nas células expostas a 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ MWCNTs após 24 h (Fig. 34A). Com 96 h, os MWCNTs diminuíram a taxa fotossintética em todas as concentrações testadas ($P<0,05$). Em células de *C. vulgaris* expostas às NFCs a taxa Fv/Fm diminuiu ($0,522\pm 0,01$; $P<0,001$) após exposição a 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (somente após 96h), enquanto nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ foi observada a redução na taxa de Fv/Fm em todos os tempos testados ($P<0,05$, Fig. 34A).

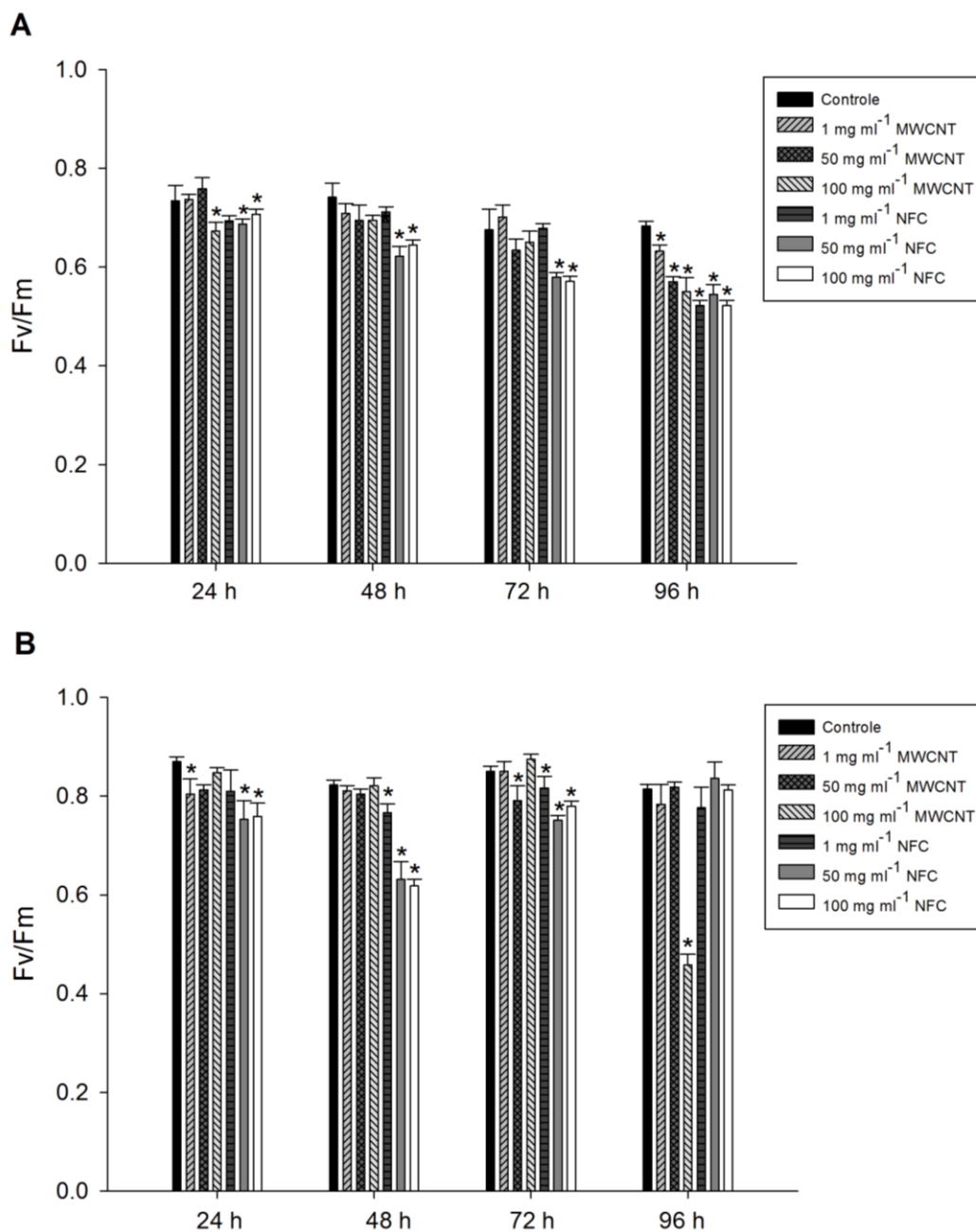


Figura 34. Eficiência quântica máxima do fotossistema II (F_v/F_m) de *C. vulgaris* submetida a diferentes concentrações de MWCNT e NFC (1, 50 e 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$) em função do tempo (24, 48, 72 e 96 horas) em meio de cultura BB (A) ou água do Rio Sena (B). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Diferenças significativas entre os grupos expostos aos nanomateriais (MWCNT ou NFC) e o controle são indicados por * $P < 0,05$.

Em água do Rio Sena, não houve redução de F_v/F_m ($P > 0,05$) em *C. vulgaris* expostas a 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ MWCNT após 48 e 96 h, em 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ MWCNT após 24, 48 ou 96 h e para 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ MWCNT até 72 h de exposição (Fig. 34B). Entretanto, em 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ MWCNT após 24 h ($0,805 \pm 0,05$, $P = 0,04$), 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ MWCNT após 72 h ($0,791 \pm 0,05$, $P < 0,001$) ou 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ MWCNT após 96 h ($0,458 \pm 0,03$, $P < 0,001$), a taxa F_v/F_m foi alterada. Não foram

observadas alterações na taxa Fv/Fm ($P>0,05$) em células expostas a $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ NFC após 24 h e $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ NFC após 96 h. Entretanto, em todas as outras condições foram observadas alterações na atividade fotossintética ($P>0,05$; Fig. 34B).

Para as microalgas filamentosas *K. flaccidum* cultivadas em meio BB a adição de MWCNT não resultou em efeitos adversos ($P>0,05$) na fotossíntese (Fig. 35). Porém, a exposição às NFCs promoveram uma redução na taxa fotossintética desta microalga nas concentrações de $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ ($0,614\pm0,06$), $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($0,655\pm0,06$) e $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ ($0,628\pm0,07$) ($P<0,001$) (Fig. 35).

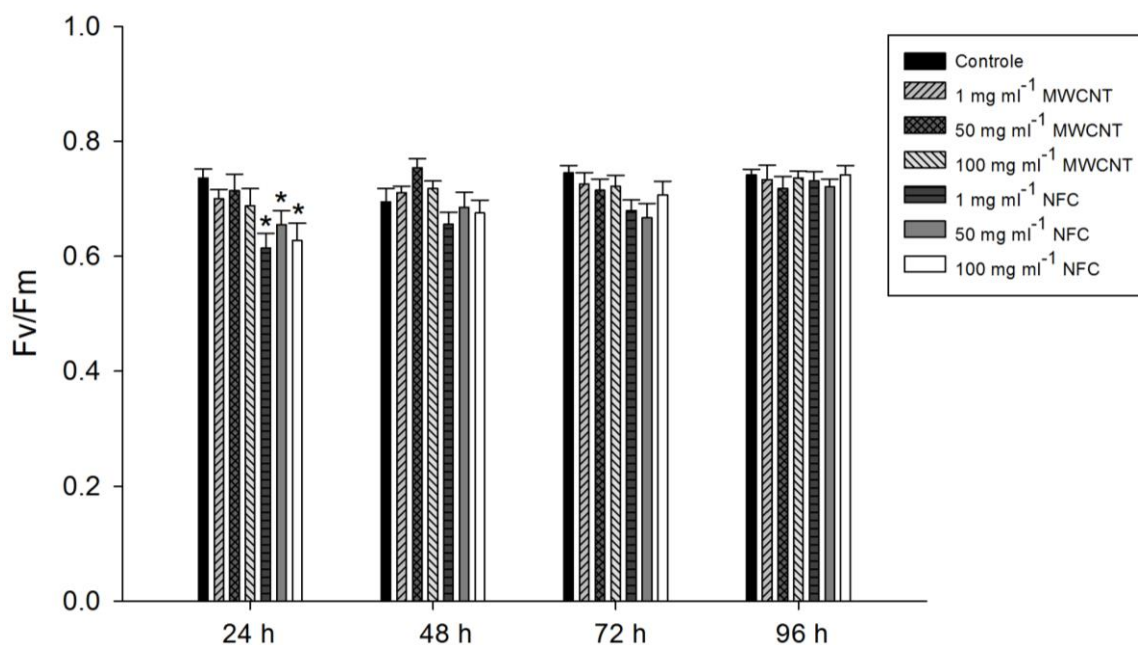


Figura 35. Eficiência quântica máxima do fotossistema II (Fv/Fm) de *K. flaccidum* submetida a diferentes concentrações de MWCNT e NFC (1 , 50 e $100 \mu\text{g ml}^{-1}$) em função do tempo (24, 48, 72 e 96 horas) em meio de cultura BB. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Diferenças significativas entre os grupos expostos aos nanomateriais (MWCNT ou NFC) e o controle são indicados por $*P<0,001$.

Os resultados do presente estudo foram consistentes com outras pesquisas que demonstraram que a taxa Fv/Fm de algas são alteradas quando exposta a nanopartículas de Ag (MIAO et al., 2009), de óxido de zinco (ZnO) (BRAYNER et al., 2010) e de TiO_2 (CHEN et al., 2012). Contudo, Schwab et al. (2011) demonstraram que a atividade fotossintética de *C. vulgaris* permaneceu inalterada após exposição a 40 mg de NTCs oxidados ou funcionalizados com pristina. Esses resultados discrepantes podem estar relacionados à funcionalização dos NTCs, uma vez que no presente estudo, foram utilizados MWCNT não funcionalizados. Vários estudos já revelaram que o tipo de funcionalização pode influenciar

na resposta tóxica dos organismos expostos aos NTCs (BIANCO, KOSTARELOS e PRATO, 2005; DUMORTIER et al., 2006; SAYES et al., 2006; VARDHARAJULA et al., 2012; JIANG et al., 2013).

Gao et al. (2013) demonstraram que um dos efeitos tóxico de NMs sobre organismos fotossintéticos é a redução da eficiência fotoquímica do fotossistema II. Assim, é possível que a exposição de *C. vulgaris* por longos períodos aos NMs tenha afetado o correto funcionamento do fotossistema II. Nas microalgas *K. flaccidum*, este efeito nocivo parece estar relacionado ao tipo de NM e menores tempos de exposição (24 h). Outra hipótese é que o acúmulo de NMs na superfície das microalgas inibiu a atividade fotossintética, devido ao sombreamento celular, diminuindo a quantidade de luz para uso da clorofila. Em adição, a inibição da fotossíntese também pode ser consequência da excessiva produção de EROs (RODEA-PALOMARES et al., 2012). Para compreender se os MWCNT ou as NFC são citotóxicos, devido a produção de radicais livres foram realizadas análises para determinar a atividade de enzimas antioxidativas, apresentadas a seguir.

5.3.5 Atividade da enzima antioxidativa SOD

A atividade da enzima antioxidativa SOD (em termos de porcentagem de inibição) foi determinada em microalgas unicelulares *C. vulgaris* e nas microalgas filamentosas *K. flaccidum*, após a exposição aos NMs. Em *C. vulgaris*, a atividade de SOD aumentou ($P < 0,05$) em células expostas aos MWCNTs ou às NFCs em meio BB e permaneceram elevadas em todos os grupos, exceto em células expostas a $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ por 96 h (Tab. 4). Em água do Rio Sena, após 24 h foi observado um aumento da atividade de SOD ($P < 0,05$; Tab. 1) para *C. vulgaris*. Não foram encontradas diferenças ($P > 0,05$) em células de *C. vulgaris* expostas a $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ NFC após 48, 72 e 96 h ou a $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ após 48 e 96 h (Tab. 4). Adicionalmente, não foram observadas alterações ($P > 0,05$) entre o grupo de *C. vulgaris* exposto a $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ MWCNT e o grupo controle após 96 h (Tab. 4).

Tabela 4 – Atividade da enzima antioxidativa SOD em microalgas unicelulares *C. vulgaris* expostas aos MWCNTs ou às NFCs em diferentes sistemas de cultivo *in vitro*.

Grupos	Sistemas de cultivo							
	Meio de cultura BB				Água do Rio Sena			
	24 h	48 h	72 h	96 h	24 h	48 h	72 h	96 h
Controle	33,29 ± 0,04 ^a	43,13 ± 0,03 ^a	43,26 ± 0,03 ^a	45,21 ± 0,03 ^a	33,55 ± 0,02 ^a	37,31 ± 0,02 ^a	39,38 ± 0,02 ^{ab}	40,41 ± 0,02 ^b
1 µg ml ⁻¹ MWCNT	92,36 ± 0,01 ^d	85,49 ± 0,04 ^d	70,60 ± 0,03 ^c	68,65 ± 0,03 ^d	92,36 ± 0,01 ^b	58,42 ± 0,07 ^b	33,29 ± 0,19 ^a	27,46 ± 0,04 ^a
50 µg ml ⁻¹ MWCNT	94,95 ± 0,01 ^d	95,34 ± 0,01 ^e	94,17 ± 0,01 ^e	90,67 ± 0,02 ^e	94,82 ± 0,01 ^b	60,10 ± 0,03 ^b	58,68 ± 0,03 ^b	40,67 ± 0,04 ^b
100 µg ml ⁻¹ MWCNT	92,75 ± 0,03 ^d	94,17 ± 0,01 ^e	94,30 ± 0,02 ^e	91,97 ± 0,02 ^e	94,56 ± 0,01 ^b	80,96 ± 0,15 ^c	83,81 ± 0,21 ^c	64,60 ± 0,20 ^d
1 µg ml ⁻¹ NFC	93,13 ± 0,01 ^d	81,22 ± 0,02 ^{cd}	81,48 ± 0,02 ^d	61,79 ± 0,02 ^c	93,52 ± 0,01 ^b	64,25 ± 0,22 ^b	51,30 ± 0,18 ^{ab}	55,18 ± 0,14 ^{cd}
50 µg ml ⁻¹ NFC	62,56 ± 0,15 ^b	77,46 ± 0,04 ^c	55,83 ± 0,03 ^b	53,24 ± 0,06 ^b	90,16 ± 0,02 ^b	37,31 ± 0,02 ^a	33,94 ± 0,25 ^a	46,37 ± 0,04 ^{bc}
100 µg ml ⁻¹ NFC	77,07 ± 0,06 ^c	65,93 ± 0,06 ^b	58,81 ± 0,06 ^b	48,32 ± 0,05 ^a	67,62 ± 0,13 ^c	33,42 ± 0,08 ^a	57,77 ± 0,03 ^b	52,20 ± 0,07 ^{bcd}

Os valores estão demonstrados na forma de média da porcentagem e erro padrão da média. Letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente de acordo com o teste *Student Newman Keus* (SNK) ao nível de 5%

Nas microalgas filamentosas *K. flaccidum* cultivadas em meio BB a atividade de SOD aumentou ($P < 0,05$) na maioria do grupos expostos aos MWCNTs ou às NFCs (Tab. 5). Contudo, no grupo de *K. flaccidum* exposto a 1 µg ml⁻¹ NFC (48 h) a atividade da enzima SOD foi menor ($P = 0,0089$) quando comparada ao grupo controle (Tab. 5).

Tabela 5 – Atividade da enzima antioxidativa SOD em microalgas filamentosas *K. flaccidum* expostas aos MWCNTs ou às NFCs em diferentes sistemas de cultivo *in vitro*.

Grupos	Meio de cultura BB			
	24 h	48 h	72 h	96 h
Controle	56±0,09 ^a	82± 0,06 ^a	66±0,28 ^a	70±0,21 ^a
1 µg ml ⁻¹ MWCNT	109±0,02 ^b	91± 0,22 ^a	85± 0,09 ^b	86± 0,18 ^{ab}
50 µg ml ⁻¹ MWCNT	123±0,19 ^c	121± 0,01 ^b	72± 0,11 ^a	70±0,21 ^a
100 µg ml ⁻¹ MWCNT	114± 0,02 ^c	107±0,02 ^b	95± 0,07 ^b	101± 0,01 ^b
1 µg ml ⁻¹ NFC	89±0,15 ^a	48±0,18 ^c	72± 0,11 ^a	60± 0,18 ^a
50 µg ml ⁻¹ NFC	128± 0,15 ^c	99±0,07 ^a	109± 0,15 ^b	97± 0,12 ^a
100 µg ml ⁻¹ NFC	70± 0,06 ^a	71±0,22 ^a	67± 0,05 ^a	63± 0,30 ^a

Os valores estão demonstrados na forma de média da porcentagem e erro padrão da média. Letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente de acordo com o teste *Student Newman Keus* (SNK) ao nível de 5%

Esses resultados são consistentes com trabalhos anteriores que demonstraram que os NTCs podem induzir produção de EROs e influenciar a viabilidade celular (JIA et al., 2005; YE et al., 2009; DI GIORGIO et al., 2011). Mais especificamente, Cheng et al. (2011) verificaram que a geração de EROs foi envolvida na ativação da via apoptótica dependente de mitocôndria em células expostas aos NTCs. Esses achados sugerem que a produção de EROs mediada por NMs pode levar à morte celular. Contudo, Meng et al. (2013) sugeriram que a incubação de células com NTCs carboxilados (MWCNT-COOH) não induziram a produção de EROs. Como previamente discutido, a funcionalização dos NTCs podem alterar sua forma de interação com as células.

A enzima SOD é uma das mais importantes enzimas antioxidantes, pois catalisa a dismutação do superóxido (O_2^-) em oxigênio e peróxido de hidrogênio. Essa ação é crucial para a proteção das células contra a ação nociva das EROs. O aumento da atividade de SOD nas células expostas aos MWCNTs ou às NFCs sugere um possível mecanismo para as microalgas *C. vulgaris* e *K. flaccidum* reduzirem a possibilidade de efeitos citotóxicos como a morte celular. Entretanto, os resultados de viabilidade anteriormente apresentados

demonstraram que em algumas condições as enzimas antioxidativas podem não ser capazes de prevenir a morte celular induzida por NMs. Assim, a produção de EROs é um dos fatores que contribuem para os efeitos nocivos de NMs em microalgas verdes de água doce.

Na água do Rio Sena, apenas a concentração de $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ MWCNT induziu a diminuição nos níveis de atividade de SOD em *C. vulgaris* após 96h de exposição (Tab. 4). O mesmo foi observado após o contato de 48h de $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ NFC e as microalgas *K. flaccidum* (Tab. 5).

Trabalhos anteriores sugerem que o acúmulo de peróxido de hidrogênio inativa a enzima SOD de maneira irreversível, devido a danos na mitocôndria (ZUPAN et al., 1996). Outra possível explicação é a diminuição da defesa antioxidante que ocorre quando as células são expostas a um desafio oxidativo agudo (CHIRINO et al., 2010). No presente estudo, podemos hipotetizar que em certas condições de cultura, as microalgas *C. vulgaris* e *K. flaccidum* tornaram-se mais vulneráveis ao estresse oxidativo, devido à baixa defesa oxidativa ou grande desafio oxidativo. Como a formação de EROs, devido a exposição de MWCNTs ou NFCs, não é clara, futuros estudos são necessários para compreender os mecanismos de indução oxidativa por NMs.

5.3.6 Níveis intracelulares de ATP

Alterações no sistema redox celular pode diminuir a produção de energia. Para verificar esse efeito, foram avaliados os níveis intracelulares de ATP após exposição aos MWCNTs e às NFCs (Fig. 36 e 37). Em meio BB, os níveis de ATP de *C. vulgaris* diminuíram após 24, 48 e 96 h de exposição a ambos os NMs ($P < 0,001$; Fig. 36A). Entretanto, os níveis de ATP não foram alterados ($P > 0,05$) após 72 h nas células de *C. vulgaris* expostas a $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ ($88,07\% \pm 2,00$) e $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ NFC ($88,71\% \pm 2,00$) em meio BB (Fig. 36A).

Em *C. vulgaris* cultivadas em água do Rio Sena, os NMs diminuíram os níveis de ATP em todos os tempos testados ($P < 0,001$), exceto para $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ NFC após 24 h ($90,13\% \pm 5,00$) ou para $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ MWCNT ($107,22\% \pm 4,00$) e $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ MWCNT ($100,84\% \pm 5,00$) após 72 h ($P > 0,05$; Fig. 36B).

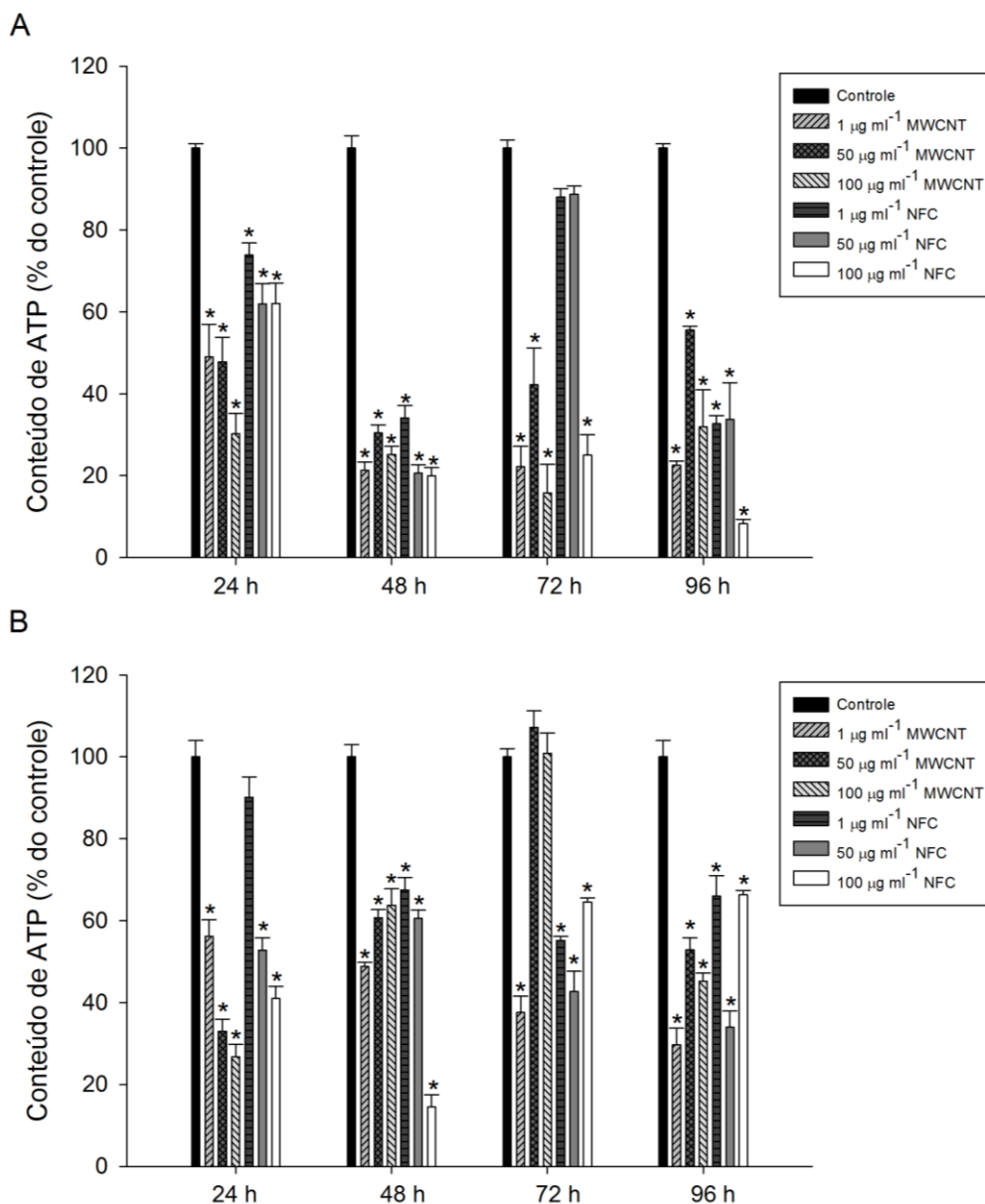


Figura 36. Conteúdo de ATP em células das microalgas *C. vulgaris* expostas a diferentes concentrações de MWCNT e NFC (1, 50 e 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$) em função do tempo (24, 48, 72 e 96 horas) em meio de cultura BB (A) ou água do Rio Sena (B). Dados apresentados em média e erro padrão. Diferenças significativas entre os grupos expostos aos nanomateriais (MWCNT ou NFC) e o controle são indicados por * $P < 0,05$.

Para a microalga *K. flaccidum*, 24 h de exposição aos MWCNTs não causaram diminuição nos níveis de ATP ($P > 0,05$), porém as NFCs diminuíram os níveis de ATP ($P < 0,05$) em todas as concentrações (Fig. 37). Após 48 h, apenas 1 μg MWCNT ($69,41\% \pm 1,02$), 1 μg NFC ($61,90\% \pm 1,11$) e 100 μg NFC ($34,84\% \pm 1,20$) alteraram os níveis de ATP. Com 72 h de exposição, os níveis de ATP em *K. flaccidum* foram alterados em ambos os NMs e em todas as concentrações testadas (Fig. 37; $P < 0,05$). Com 96h, o conteúdo

de ATP foi alterado ($P < 0,05$) nas concentrações de $1 \mu\text{g MWCNT}$ ($68,63\% \pm 1,00$), $100 \mu\text{g MWCNT}$ ($42,28\% \pm 9,00$) e $50 \mu\text{g NFC}$ ($31,05\% \pm 6,00$) (Fig. 37).

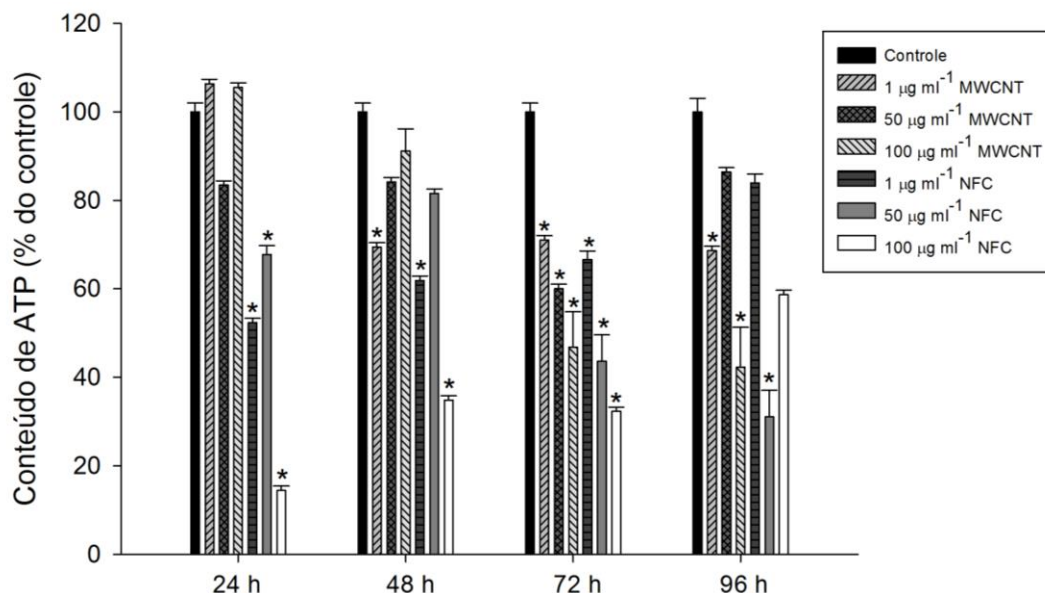


Figura 37. Conteúdo de ATP em células das microalgas *K. flaccidum* expostas a diferentes concentrações de MWCNT e NFC (1 , 50 e $100 \mu\text{g ml}^{-1}$) em função do tempo (24 , 48 , 72 e 96 horas) em meio de cultura BB. Dados apresentados em média e erro padrão. Diferenças significativas entre os grupos expostos aos nanomateriais (MWCNT ou NFC) e o controle são indicados por $*P < 0,05$.

Pouco se conhece sobre os efeitos potenciais de NMs nas mitocôndrias. Alguns estudos demonstraram que partículas ultrafina de carbono e nanopartículas de ferro valência zero induziram a diminuição nos níveis de ATP celular (WILSON et al., 2002; PHENRAT et al., 2009). Além da produção de ATP, as mitocôndrias são responsáveis pela geração de EROs e regulação da morte celular (CHRISTOPHE e NICOLAS 2006). A disfunção dessa organela pode contribuir com a morte celular pela redução na produção de ATP, aumento na produção de EROs e liberação de proteínas reguladoras da morte celular. Portanto, a integridade da mitocôndria está relacionada à viabilidade celular. Fariss (2005) demonstrou que EROs causam dano ao genoma mitocondrial, prejudicando a atividade dessa organela. O ATP é a molécula de energia mais utilizada pelas células vivas, e seu declínio é indicativo de perda de função mitocondrial. Assim, os níveis de ATP representam o estado metabólico de células ativas. No presente estudo, a mudança nos níveis intracelulares de ATP de células das microalgas tratadas com NMs comparada com as do grupo controle sugere que tanto os MWCNTs quanto as NFCs prejudicam o metabolismo energético de *C. vulgaris* e *K. flaccidum*.

5.3.7 Microscopia eletrônica de varredura e de transmissão

Com o objetivo de estudar potenciais alterações morfológicas e ultraestruturais em células de *C. vulgaris* e *K. flaccidum* expostas aos NMs ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$ após 48 h) foram realizadas as técnicas de MEV e MET. Nas Figuras 38A e 38G, pode-se observar células do grupo controle com a estrutura arredondada, típica de *C. vulgaris* e em filamentos, característica de *K. flaccidum*. Entretanto, em células tratadas com MWCNTs e NFCs foi observado encolhimento celular para ambas as microalgas *C. vulgaris* (Fig. 38B e 38E) e *K. flaccidum* (Fig. 38H e 38I).

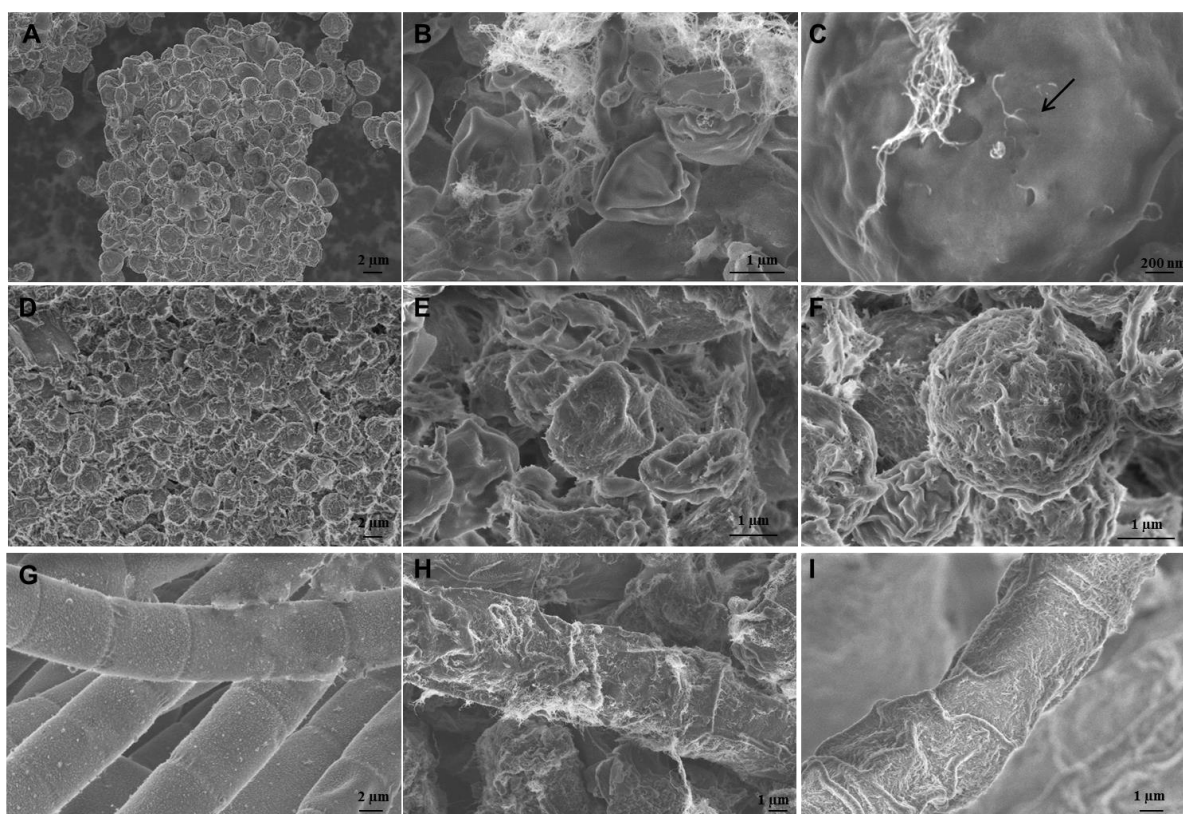


Figura 38. Micrografia eletrônica de varredura de células de *C. vulgaris* (A-F) e *K. flaccidum* (G-I) expostas a $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ de MWCNT ou NFC por 48 horas. Controle de *C. vulgaris* (A), *C. vulgaris* expostas a MWCNTs em água do Rio Sena (B) ou meio BB (C). *C. vulgaris* expostas a NFCs em água do Rio Sena (D, E) ou meio BB (F). Controle de *K. flaccidum* (G), *K. flaccidum* expostas a MWCNTs (H) ou as NFCs (I). A seta demonstra alguns MWCNT lesionando a superfície de *C. vulgaris* (C).

As Figuras 38F e 38I sugerem que as microalgas expostas às NFCs foram envoltas por estrutura semelhante a um gel. Esse fenômeno pode ser explicado pela fisiologia das microalgas e/ou pelas características dos NMs utilizados neste trabalho. Estudos anteriores constataram que a interação entre os NMs e o fitoplâncton produz substâncias poliméricas

extracelulares (EPS) (BRAYNER et al., 2010; CHEN et al., 2011). Geralmente, esse aumento da produção de EPS ocorre em resposta a presença de poluentes (PISTOCCHI et al., 2000). Em estudos de nanotoxicidade, Brayner et al. (2010) sugeriram que os polissacarídeos produzidos pela *Anabaena flo-aquae* evitaram a internalização de partículas. A celulose, polissacarídeo constituinte das NFCs é composta de longas cadeias poliméricas de glicose. No presente estudo, é possível hipotetizar que as cadeias poliméricas das NFCs tenham sido reticuladas pelos EPS produzidos pelas microalgas, formando assim a substância gelatinosa visualizada. Esta grande adsorção de NMs na parede celular pode ter prejudicado as trocas gasosas e o transporte de nutrientes pela membrana plasmática das microalgas. Assim, a adsorção de NFCs na superfície celular pode ter sido a causa da baixa atividade fotossintética observada em *C. vulgaris K. flaccidum*. Os resultados obtidos pela MEV evidenciaram que os MWCNTs associaram-se com a membrana plasmática de *C. vulgaris* (Fig. 38C), sugerindo que os NTCs podem ultrapassar a parede celular e a membrana plasmática e entrar nas células.

De fato, seções ultrafinas de células expostas aos MWCNT em meio BB, obtidas por MET, demonstraram a presença de MWCNTs dentro do citoplasma de *C. vulgaris* (Fig. 39B), enquanto esses NMs não foram observados dentro de *K. flaccidum* (Fig. 39H). Em relação às NFCs, não foram encontradas evidências deste NM dentro de ambas as microalgas (Fig. 39C, 39F e 39I). Estes resultados podem ser explicados pelo fato de que a entrada de NMs dentro das células depende das propriedades e características de superfície desses materiais, bem como do tipo celular estudado. A alta razão de aspecto, rigidez dos MWCNTs quando comparado às NFCs podem ter facilitado a passagem desses NMs pelas barreiras celulares de *C. vulgaris*. Outra possível explicação é o fato de que NMs com características hidrofóbicas podem passar mais facilmente pelas membranas plasmáticas (JANG, LIM e CHOI, 2010). Contudo, poucos MWCNTs livres foram observados dentro da célula (Fig. 39B). Esses resultados estão de acordo com Wei et al. (2010) os quais sugeriram que somente NMs e pequenos agregados de NMs possuem capacidade para passar pela parede celular e atingir a membrana plasmática. Por outro lado, a perda da integridade da parede celular (Fig. 39B) pode ter facilitado a entrada de MWCNT dentro das células.

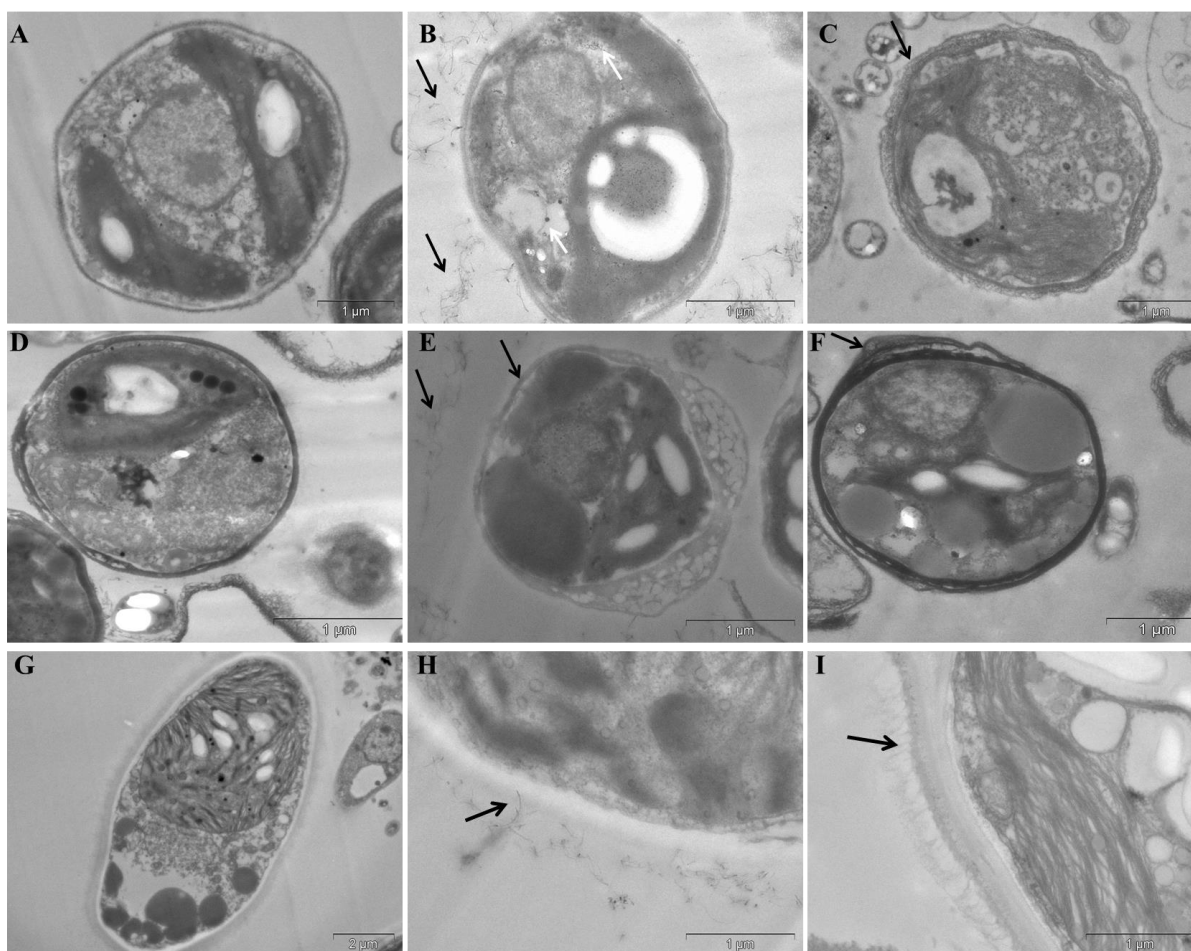


Figura 39. Micrografia eletrônica de transmissão de *C. vulgaris* e *K. flaccidum* expostas a $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ de MWCNT ou NFC após 48 horas. Controle de *C. vulgaris* em meio BB (A), *C. vulgaris* em meio BB expostas a MWCNT (B), *C. vulgaris* em meio BB expostas a NFCs (C), Controle de *C. vulgaris* em água do Rio Sena (D), *C. vulgaris* em água do Rio Sena expostas aos MWCNTs (E), *C. vulgaris* em água do Rio Sena expostas as NFCs (F). Controle de *K. flaccidum* (G), *K. flaccidum* em meio BB expostas aos MWCNTs (H), *K. flaccidum* em meio BB expostas as NFCs (I). Setas escuras: NMs no meio extracelular; Setas brancas: NMs no meio intracelular.

Nas células de *C. vulgaris* cultivadas em água do Rio Sena não foi observada internalização de MWCNTs (Fig. 39E). Uma possível explicação para esse fenômeno pode ser o meio de cultura celular (meio de cultura BB ou água do Rio Sena). Os diferentes sistemas de cultura *in vitro* podem alterar a interação de MWCNT com as células de *C. vulgaris*. Recentemente, estudos *in vitro* demonstraram que a composição dos meios de cultura afeta a expressão de proteínas que compõe a membrana plasmática e este fato pode influenciar a internalização de MWCNTs (HANIU et al., 2013). Futuros estudos são necessários para melhor compreensão da interação de MWCNTs com as microalgas em diferentes meios de cultura.

A adsorção de MWCNT e NFC na superfície celular pode ter resultado no distúrbio da parede celular e membrana plasmática. Possivelmente, esta perda da integridade da membrana plasmática ocasionou a morte celular. Imagens de MET de *C. vulgaris* expostas aos MWCNTs em ambos os meios de cultura BB e água do Rio Sena demonstraram dano nas membranas celulares (Fig. 39B, 39E). As micrografias demonstraram células que perderam parte da integridade da sua membrana celular. Essas lesões podem ter ocasionado a liberação de conteúdo citoplasmático. Somente células em processo de morte celular, com a membrana danificada são coradas com o Azul de Tripán. Assim, os resultados deste teste corroboraram os achados microscópicos.

Não está claro se a internalização de partículas é relevante para a indução de efeitos intracelulares ou se a toxicidade pode ser devido à adsorção de NMs na membrana celular (RODEA-PALOMAS et al., 2011). Pode-se hipotetizar que tanto a aderência de MWCNTs e NFCs na superfície das algas, quanto a internalização de MWCNTs podem ter contribuído para a ruptura da parede e membrana celular, para as alterações morfológicas e para os efeitos tóxicos identificados.

Dos estudos acima mencionados verificou-se que em determinadas condições a exposição dos MWCNT e das NFC afetam a viabilidade celular e o crescimento das microalgas *C. vulgaris* e *K. flaccidum*. Esta toxicidade dos NMs pode estar relacionada a várias causas. Os NMs possivelmente alteram o crescimento celular e causam a morte devido ao estresse oxidativo, alterações na produção de ATP, diminuição da atividade fotossintética e estresse físico. A internalização de MWCNTs nas células ocorreu em *C. vulgaris* cultivadas em meio BB, mas o mesmo não foi observado em células de *C. vulgaris* cultivadas em água do Rio Sena ou em células de *K. flaccidum*. Apesar das NFCs não terem sido encontradas dentro dessas microalgas, estes NMs foram observados aderidos a superfície de ambas as microalgas *C. vulgaris* e *K. flaccidum*, fato que pode ter sido determinante para a ocorrência de efeitos citotóxicos. A Tabela 6 apresenta um resumo geral dos resultados dos testes de citotoxicidade para as microalgas avaliadas.

Tabela 6 – Resumo geral dos principais resultados dos testes de citotoxicidade para *C. vulgaris* e *K. flaccidum* expostas aos MWCNT ou às NFCs comparados aos grupo controle.

<i>C. vulgaris</i> em diferentes sistemas de cultivo (1; 50 e 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de MWCNT ou NFC por 24, 48, 72 e 96h)						
Grupos	Proliferação Celular	Viabilidade Celular	Eficiência Fotossintética	Atividade de SOD	Níveis de ATP	Internalização de NMs
MWCNT em meio BB	Baixa	Baixa	Semelhante ate 72h	Alta	Baixo	Presente
NFC em meio BB	Baixa	Baixa	Baixa	Alta	Baixo	Ausente
MWCNT em água do Rio Sena	Semelhante na concentração de 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$	Baixa	Semelhante	Alta	Baixo	Ausente
NFC em água do Rio Sena	Semelhante na concentração de 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$	Baixa	Baixa	Alta	Baixo	Ausente
<i>K. flaccidum</i> em diferentes sistemas de cultivo (1; 50 e 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de MWCNT ou NFC por 24, 48, 72 e 96h)						
Grupos	Proliferação Celular	Viabilidade Celular	Eficiência Fotossintética	Atividade de SOD	Níveis de ATP	Internalização de NMs
MWCNT em meio BB	Baixa após 48h	Baixa	Semelhante	Alta	Baixa	Ausente
NFC em meio BB	Baixa após 48h	Baixa	Baixa apenas com 24h	Alta	Baixa	Ausente

5.4 EXPERIMENTO 4 - TRANSFECCÃO *IN VITRO* DE FIBROBLASTOS E EMBRIÕES BOVINOS UTILIZANDO MWCNT-COOH CONJUGADOS COM PLASMÍDEOS MARCADOS COM GFP

5.4.1 Ensaio de retardo da mobilidade eletroforética

Visando testar a utilização de NTCs como método alternativo para carrear genes exógenos para fibroblastos e embriões bovinos, foi testada a capacidade de transfecção de MWCNT-CHOH complexado ao vetor pLGW contendo o gene GFP (pGFP). Primeiramente, foi realizado o ensaio de retardo da mobilidade eletroforética para se estudar a interação entre o DNA (pGFP) e os agentes transfectantes. Como demonstrado na Figura 40, o complexo MWCNT-COOH:pGFP (em solução a 150 mmol de NaCl) incubado a temperatura ambiente (poços 11-13) ou o complexo PEI:pGFP, utilizado como controle positivo (poços 17-19) apresentaram uma mobilidade eletroforética mais lenta quando comparada àquela exibida pelas amostras de MWCNT-COOH:pGFP complexado em temperatura ambiente, MWCNT-COOH:pGFP complexado em ultrassom com gelo, pGFP puro e pGFP puro submetidos ao ultrassom.

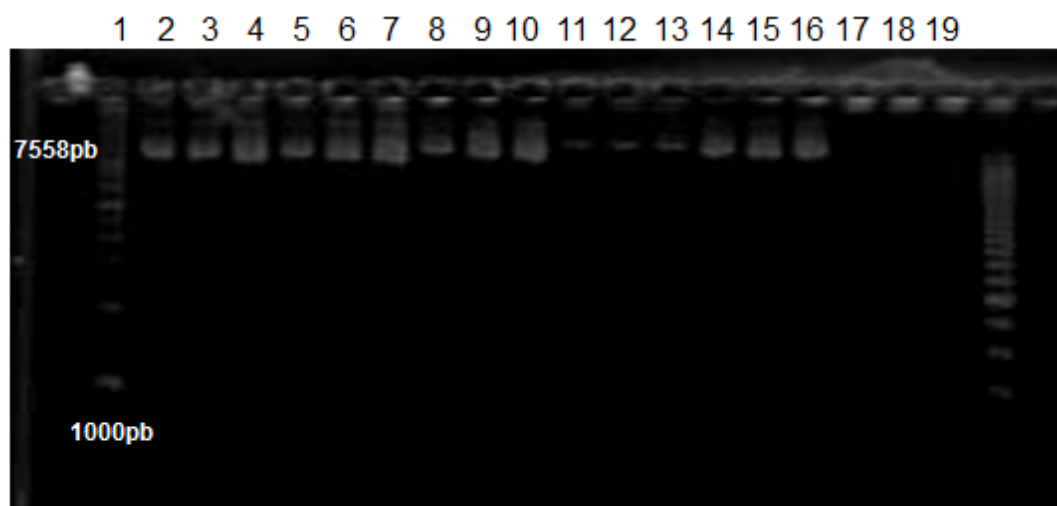


Figura 40. Gel de agarose a 0,8% corado com brometo de etídeo para análise da interação de agentes transfectantes (MWCNT-COOH e PEI) e DNA plasmidial (pGFP). **1:** marcador de peso molecular de 1kb. **2-4:** pGFP puro. **5-7:** pGFP puro em ultrassom. **8-10:** MWCNT-COOH:pGFP complexado em temperatura ambiente. **11-13:** MWCNT-COOH:pGFP complexado em temperatura ambiente e 150 mmol de NaCl. **14-16:** MWCNT-COOH:pGFP complexado em ultrassom. **17-19:** PEI:pGFP

A mobilidade mais lenta indica que as moléculas de DNA estão complexadas aos agentes transfectantes de maneira mais estável, uma vez que a mobilidade eletroforética de um ácido nucléico altera-se quando os NTCs ou os polímeros de PEI ligam-se a ele. Para o PEI, foi observada grande eficiência de complexação (Fig. 40, poços 17-19), provavelmente por sua natureza química que o capacita a ser utilizado como agente de transfecção em vários tipos celulares (TOLEDO et al., 2008; YAMANO, DAI e MOURSI, 2010). O método de transfecção com PEI foi descrito por Boussif et al. (1995) e é baseado na formação de um complexo entre a carga positiva da molécula do polímero e a carga negativa do DNA. A carga positiva do PEI é proveniente das aminas protonadas que o constituem. Semelhantemente aos lipossomos, a carga total positiva do complexo PEI:DNA pode aproximar-se da membrana plasmática e ser endocitado. Porém, esses carreadores causam citotoxicidade, pois podem gerar quebras na estrutura da membrana plasmática (TERRADELAS, 2009).

Para a formação dos complexos MWCNT-COOH:pGFP, o uso de ultrassom com gelo não foi eficiente (Fig. 40, poços 14-16). Contudo, estudos anteriores complexaram eficientemente SWCNT com ácido ribonucleico de interferência (iRNA) nestas condições (LADEIRA et al., 2010). Neste caso, a baixa temperatura (aproximadamente 4°C) promoveu uma dispersão aquosa efetiva devido a um maior acoplamento acústico entre o recipiente e o banho. Em adição, nessa temperatura os processos de cavitação foram reduzidos, garantindo uma maior estabilidade e cinética na formação do complexo. Porém, essa metodologia não teve o mesmo resultado quando comparado ao presente estudo, possivelmente devido a diferenças estruturais e químicas entre os NTCs e os ácidos nucleicos utilizados.

Por outro lado, a complexação dos MWCNT-COOH e DNA plasmidial em temperatura ambiente em solução salina contendo NaCl foi mais eficiente (Fig. 40, poços 11-13) quando comparado aos sistemas de complexação dos MWCNT-COOHs sem esse sal em temperatura ambiente ou em ultrassom com gelo (Fig. 40, poços 8-10 ou 14-16). A adição de NaCl ao sistema fornece um potencial iônico favorável a interação das moléculas de DNA com os NTCs (LIU et al., 2011; XU et al., 2011). Isso ocorre, provavelmente, pela ação dos cátions sódio (Na^+) que blindam a carga negativa dos grupos fosfatos, minimizando a repulsão entre esses grupos, favorecendo assim a conformação helicoidal da dupla hélice.

A conformação helicoidal é um fator determinante para que a molécula de DNA se enrole ao longo do eixo dos NTCs por meio de interações não covalentes do tipo *pi-stacking* (ZHENG et al., 2003). Mais precisamente, a configuração helicoidal da fita de DNA possibilita que as bases nitrogenadas se posicionem de forma paralela à superfície do NTCs,

maximizando as interações entre as nuvens *pi* dos dois materiais, a qual é responsável pela estabilidade dos híbridos formados. Portanto, uma força iônica adequada parece ser importante para fornecer um potencial iônico no meio que seja energeticamente favorável a interação e estabilidade de moléculas de DNA com os NTCs.

5.4.2 Avaliação da transferência gênica em fibroblastos

5.4.2.1 Microscopia de fluorescência e citometria de fluxo

Em fibroblastos, pode-se verificar que o complexo pGFP:MWCNT-COOH foi capaz de transfectar as células (Fig. 41 C). Porém, visualmente, observou-se maior quantidade de células GFP positivas (GFP+) utilizando-se o reagente PEI (Fig. 41 D). Não foram observadas fluorescências nas células sem DNA plasmidial (Fig. 41 A) ou com DNA plasmidial sem agente transfectante (Fig. 41 B).

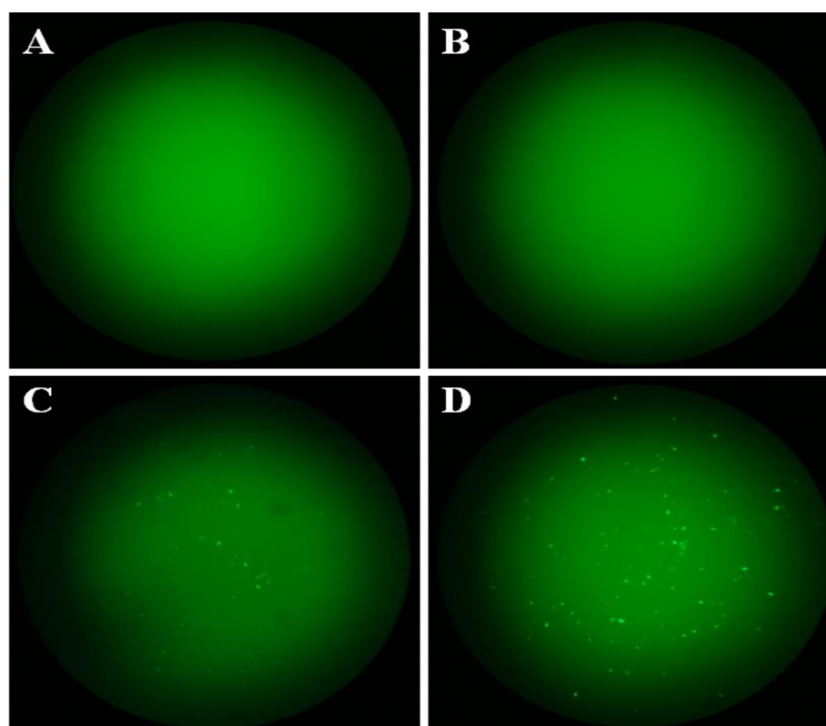


Figura 41. Capacidade de transfecção de MWCNT-CHOO e PEI em fibroblastos bovinos cultivados *in vitro* com o plasmídeo pLGW (pGFP). **A**: controle (sem pGFP); **B**: pGFP puro; **C**: complexo pGFP:MWCNT-CHOO e **D**: complexo pGFP:PEI.

Na quantificação das células fibroblásticas expressando a proteína GFP por citometria de fluxo, foi possível a detecção das células transfectadas por ambos os métodos (PEI e MWCNT-COOH). Na Figura 42 está demonstrado que a porcentagem de células GFP+ foi menor ($P < 0,05$) nos grupos de células sem DNA plasmidial ($0,05 \pm 0,12\%$) e células com DNA plasmidial sem agente transfectante ($0,07 \pm 0,23\%$) quando comparados com fibroblastos transfectados com o MWCNT-COOH ($3,30 \pm 0,36\%$) ou PEI ($3,96 \pm 1,42\%$).

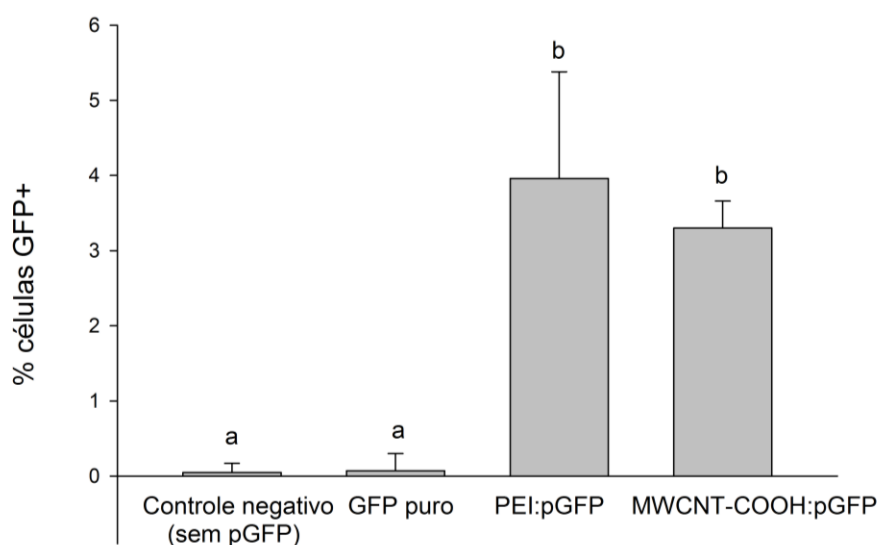


Figura 42. Porcentagem de células GFP positivas (GFP+) analisadas por citometria de fluxo 48 horas pós-transfecção utilizando MWCNT-COOH ou polietilenoimina (PEI). Dados apresentados em média e erro padrão da média. Letras diferentes indicam diferenças significativas ao nível de 5%.

A eficiência de transfecção dos NTCs pode ser influenciada pelo método de funcionalização (AHMED et al., 2009; LIU et al., 2013), tamanho e característica (YANG et al., 2011) e relação entre a quantidade de NTCs e DNA complexados. No presente estudo, testes preliminares foram realizados para a determinação da melhor relação de MWCNT-COOH e pGFP que possibilitasse a transfecção de fibroblastos. Dentre as relações estudadas, a mais efetiva foi a de $1,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ MWCNT-COOH para $0,3 \mu\text{g ml}^{-1}$ pGFP (5:1) que resultou em células expressando a proteína GFP quando avaliadas por microscopia de fluorescência. Outro aspecto considerado foi utilizar concentrações de MWCNT-COOH não tóxicas para fibroblastos bovinos obtidas no experimento 1. O método de transfecção controle (PEI), assim como os MWCNT-COOH, também apresentou baixa porcentagem de células GFP+ (Fig. 42). Esses resultados precisam ser mais investigados, uma vez que outros fatores podem ter

influenciado no processo de transfecção. Coonrod e Horwitz (1997) observaram que a integridade do DNA que chega ao núcleo parece ser determinante para a eficiência de transferência gênica. De fato, a degradação dos ácidos nucleicos por nucleases citoplasmáticas durante a internalização celular ou trânsito até o núcleo, bem como a fusão de endossomos contendo o DNA exógeno com os lisossomos é determinante para o sucesso da transfecção (WATTIAUX et al., 2000; SANZ et al., 2011). Os métodos não-virais, incluindo os NTCs, tem demonstrado, na maioria da vezes, internalização por endocitose (KAM, LIU e DAI, 2006) que pode levar ao aprisionamento e degradação do DNA exógeno pelos lisossomos. Contudo, outros estudos revelaram que os NTCs podem passar livremente pela membrana plasmática, sem formação de endossomos e que o processo de encapsulamento dos ácidos nucleicos dentro deste NM favorece sua proteção contra degradação por nucleases intracelulares (PATIL et al., 2008; WU et al., 2008; CHEUNG et al., 2010).

No presente trabalho, quando comparada com uma técnica de referência, a baixa eficiência de ambos os métodos de transfecção (MWCNT-COOH e PEI) pode estar associada simultaneamente aos fatores supracitados, mas também a origem e tipo de célula utilizada. Estudos anteriores observaram que culturas primárias de fibroblastos humanos são difíceis de serem transfectados (BAUM et al., 1994; VEELKEN et al. 1994; JORDAN et al., 2008), enquanto células imortalizadas HeLa são facilmente transfectadas e com alta eficiência. Ensaio utilizando NTCs como carreadores gênicos, apresentaram alta eficiência de transfecção em células HeLa (LIU et al., 2011; YANG et al., 2011; HUANG et al., 2013). A maior propensão a transfecção de células imortalizadas tem sido atribuída ao tempo que o DNA exógeno fica dentro do núcleo. Em células primárias, o DNA exógeno é rapidamente eliminado do núcleo, fato que não ocorre em células HeLa (COONROD e HORWITZ, 1997). Quando as células primárias são tratadas com inibidores de proteases lisossomais a transfecção é aumentada. No presente estudo, foram utilizados fibroblastos provenientes do estoque de células congeladas na 2ª passagem, sendo consideradas, portanto, células de linhagem secundária. Contudo, possivelmente estas células podem ter mantido alguma dessas características de células primárias que diminuem a eficiência da transfecção gênica.

Outra possível explicação para as baixas taxas de transfecção podem estar relacionadas a natureza do plasmídeo. Há indícios de que a topologia da molécula de DNA plasmidial pode favorecer os níveis de expressão gênica (CHANCHAM e HUGHES, 2001). O plasmídeo utilizado no presente estudo (pLGW) possui estrutura circular. Nesta condição, normalmente, um plasmídeo possui as duas extremidades de cada fita ligadas covalentemente

por ligações fosfodiéster intactas, o que dificulta a integração do plasmídeo ao DNA hospedeiro. No entanto, a forma circular aberta não é a mais frequente conformação dessa molécula. Há uma forma mais compacta, denominada *supercoiled* (superenrolada- SC), que parece ser mais abundante nas células bacterianas (PRAZERES, SCHLUEP e COONEY, 1998). Essa estrutura conformacional se organiza espontaneamente, quando uma das extremidades da dupla hélice gira em torno da outra antes do fechamento da molécula, levando a uma tensão que só é minimizada quando o DNA pode enrolar-se. A forma SC é termodinamicamente mais favorável a processos de replicação e transcrição. Um DNA SC pode retornar à conformação *open-circular* (circular aberta) caso apenas uma das fitas seja clivada em uma de suas ligações fosfodiéster (a fita clivada girará ao redor da intacta até restabelecer o estado de repouso), ou tornar-se linear caso as duas fitas sejam clivadas. A forma superenrolada foi descrita como a mais indicada para transfecção por favorecer a inserção no genoma hospedeiro e a expressão dos transgenes (HIROSE, TSUDA e SUZUKI, 1985; MAUCKSCH et al., 2009). Por outro lado, Chancham e Hughes (2001) observaram que os plasmídeos lineares são os mais eficientes no estabelecimento de uma transfecção estável quando comparado a forma circular superenrolada. Os plasmídeos lineares tendem a formar complexos com uma quantidade cinco vezes menor de agente transfectante em relação ao plasmídeo circular (GROLL, 2003). Portanto, a estrutura do plasmídeo utilizado no presente estudo também pode ter influenciado nas baixas taxas de transfecção observadas nos fibroblastos transfectados com MWCNT-COOH ou PEI.

5.4.2.2. PCR em tempo real para a identificação do gene GFP

Análises de PCR em tempo real foram realizadas utilizando o DNA genômico dos fibroblastos expostos aos complexos pDNA-MWCNT e *primers* específicos para o gene GFP. A especificidade do produto foi verificada pela curva de *melting*. Não foram observados produtos inespecíficos ou dímeros de primers nos produtos de PCR (Fig. 43A). Posteriormente, os produtos do PCR em tempo real foram submetidos a gel de agarose e os resultados confirmam a presença do fragmento de 214 pb do gene GFP nos fibroblastos (Fig. 43B).

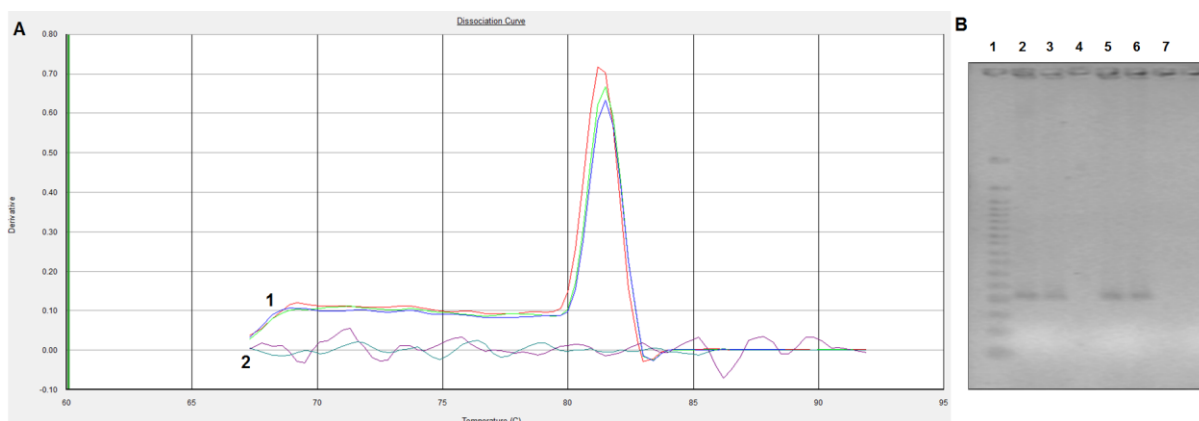


Figura 43. **A:** Curvas de dissociação do gene GFP em fibroblastos bovinos obtidas após amplificação por PCR em tempo real. (1) Fibroblastos GFP+ transfetados com o complexo MWCNT-COOH:pGFP e PEI:pGFP, (2) Fibroblastos GFP negativos e controle negativo. **B:** Gel de agarose mostrando a presença do gene GFP (214 pb) em fibroblastos bovinos cultivados *in vitro* transfetados com o complexo MWCNT-COOH:pGFP e PEI:pGFP após PCR em tempo real. (1) Peso molecular (PM), (2 e 3) MWCNT-COOH:pGFP (4) Controle negativo, (5-6) PEI:pGFP, (7) Controle negativo.

5.4.3 Avaliação da transferência gênica em embriões

5.4.3.1 Microscopia de fluorescência

Visando testar a utilização de NTCs como método alternativo de transfecção em embriões bovinos, foi testada a capacidade de transfecção de MWCNT-COOH complexados aos plasmídeos pGFP. No experimento 2, foi verificado que a concentração de $0,2 \mu\text{g ml}^{-1}$ apesar de alterar a expressão de alguns genes, não alterou a taxa de eclosão, degeneração ou apoptose embrionária. Partindo-se dessa concentração inicial, os MWCNT-COOH foram complexados ao vetor pLGW contendo o gene GFP (pGFP) nas relações 1:1 ($0,2 \mu\text{g}$ MWCNT-COOH para $0,2 \mu\text{g}$ pGFP), 10:1 ($2 \mu\text{g}$ MWCNT-COOH para $0,2 \mu\text{g}$ pGFP) e 20:1 ($4 \mu\text{g}$ MWCNT-COOH para $0,2 \mu\text{g}$ pGFP).

Na Figura 44 pode-se verificar que os complexos MWCNT-COOH:pGFPs foram capazes de transfectar os embriões bovinos produzido *in vitro*. A expressão do gene para GFP foi avaliada por fluorescência *in situ* três dias após a transfecção (estágio de 2 a 8-células). Esses resultados indicaram que o complexo MWCNT-COOH:pGFP foi capaz de passar pela zona pelúcida e o plasmídeo pGFP atingiu o núcleo do zigoto. Posteriormente, o gene GFP foi transcrito e traduzido na proteína verde fluorescente. Foram transfectados zigotos recém-fertilizados (6 h pós fertilização), uma vez que o estágio precedente a 2 células é o mais indicado para a inserção de DNA exógeno (BALDASSARRE et al., 2004).

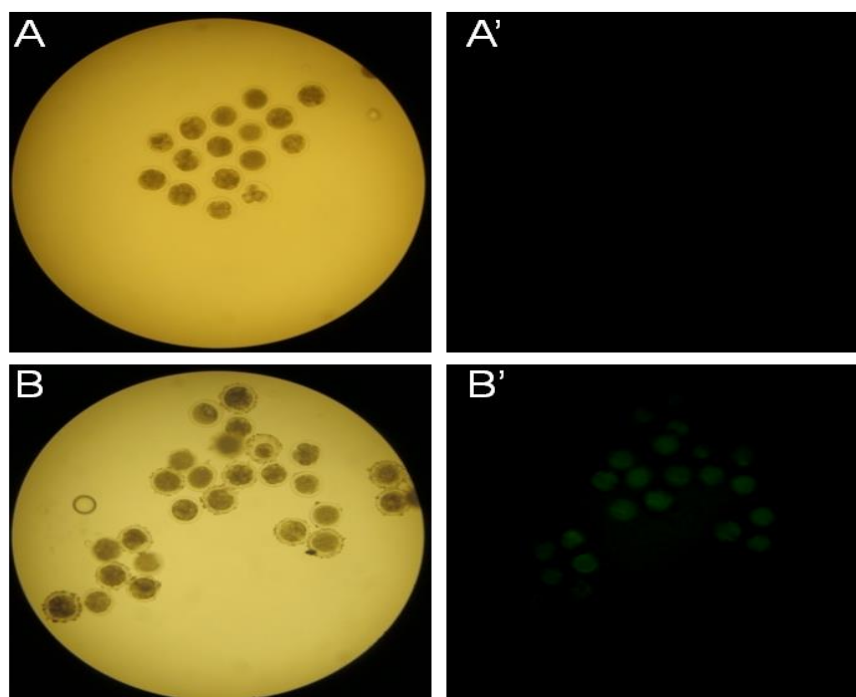


Figura 44. Capacidade de transfecção de MWCNT em embriões bovinos (estágio 2 a 8 células) cultivados *in vitro* com o plasmídeo pLGW (relação 20:1). **A**: embriões controle em luz branca, **A'**: embriões controle em luz ultravioleta (sem MWCNT:pGFP). **B**: embriões incubados com complexo MWCNT:pGFP em luz branca. **B'**: embriões incubados com MWCNT:pGFP expressando a proteína verde fluorescente (GFP) em luz ultravioleta.

Os embriões desenvolveram-se normalmente até o estágio de blastocisto, porém a expressão de GFP não foi verificada neste estágio. Possivelmente, a expressão deste gene foi suprimida no estágio de blastocisto conferindo uma expressão transiente ou temporária. Isso ocorre quando o DNA exógeno é inserido no núcleo, porém não há incorporação ao cromossomo (AHMED, 2000). Desta forma, as proteínas são expressas por um curto intervalo de tempo, período após o qual provavelmente as células excluem o segmento.

Caso, o DNA exógeno seja inserido no genoma, a expressão de um transgene pode variar devido a uma série de fatores, incluindo os efeitos do número de cópias inseridas num mesmo genoma e a tendência de o DNA exógeno sofrer rearranjo antes de integrar-se (FUJIWARA et al., 2003). Adicionalmente, a expressão do transgene é influenciada pela sua localização no genoma hospedeiro, em relação a elementos de controle transcricional, regiões de heterocromatinas não-transcritas dos cromossomos ou regiões silenciadas por metilação (HOFMANN et al., 2006). Acredita-se que as melhores regiões de integração de um transgene que favoreçam a expressão sejam as de eucromatina (DAY et al., 2000), já que em pontos heterocromáticos o DNA pode ficar inacessível a fatores de transcrição. Punzon et al. (2003)

detectaram variabilidade e silenciamento de genes exógenos em camundongos transgênicos. Essas alterações não foram relacionadas ao número de cópias inseridas, mas ao efeito de posição do inserto, que levaram à ativação de mecanismos de silenciamento. O mesmo efeito ocorreu em outro trabalho que teve a expressão de GFP afetada devido a posição de inserção genômica deste gene repórter (HOFMANN et al., 2006). Dessa forma, é preciso compreender os mecanismos de integração do DNA exógeno bem como a sua posição, pois estes fatores podem determinar a sua expressão.

A inserção de DNA exógeno também pode induzir as células interromperem o ciclo celular na fase G1 e ativar os mecanismos apoptóticos (RENZING e LANE, 1995). Assim, teremos uma expressão transiente, pois após os ciclos de divisão celular a quantidade de células que possuem o DNA exógeno irá diminuir. Possivelmente estes fatores, associados aos descritos anteriormente para os fibroblastos, foram responsáveis pela falta de expressão de GFP no estágio de blastocisto. Provavelmente, o gene para GFP pode ter sido silenciado ou os blastômeros não continham este gene em seus núcleos após os ciclos iniciais de clivagem.

5.4.3.2 *PCR em tempo real para a identificação do gene GFP*

Embriões no estágio de 2-8 células foram submetidos a análises de PCR em tempo real para confirmação da presença do gene GFP nestas estruturas. A especificidade do produto foi verificada pela curva de *melting*. Não foram observados produtos inespecíficos ou dímeros de primers nos produtos de PCR (Fig. 45A) e os ensaios de gel de agarose confirmaram a presença do fragmento de 214pb do gene GFP nos embriões (Fig. 45B).

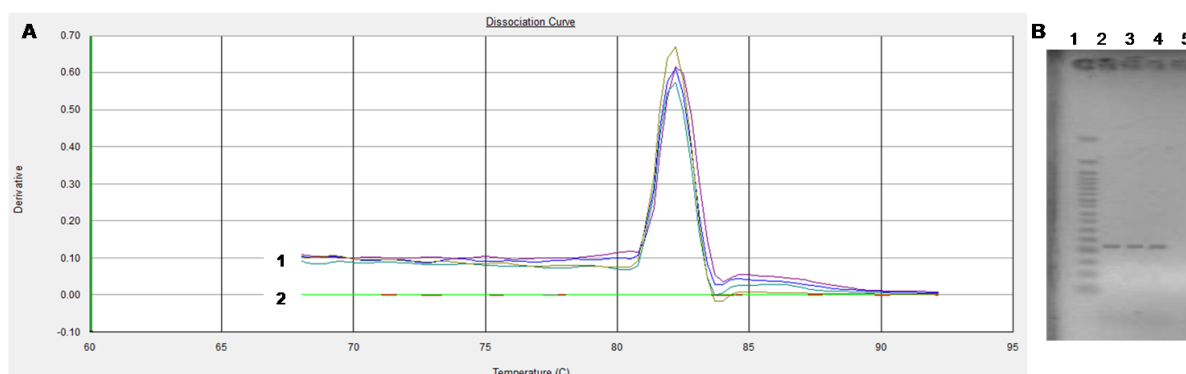


Figura 45. **A:** Curvas de dissociação do gene GFP em embriões bovinos obtidas após amplificação por PCR em tempo real. (1) Embriões GFP+ transfectados com o complexo MWCNT-COOH:pGFP, (2) Embriões GFP negativos e controle negativo. **B:** Gel de agarose mostrando a presença do gene GFP (214 pb) em embriões bovinos produzidos *in vitro* transfectados com o complexo MWCNT-COOH:pGFP após PCR em tempo real. (1) Peso molecular (PM), (2) MWCNT:pGFP relação 1:1, (3) MWCNT:pGFP relação 1:10, (4) MWCNT:pGFP relação 1:20, (5) Controle negativo.

Na tabela 7 estão as porcentagens de embriões que apresentaram bandas GFP + após transfecção gênica com os complexos de MWCNT-pDNA na relação 1:1 e 1:10 foram de 1/30 (3,33%) e para a relação 1:20 foi de 14/30 (46,67%). Assim, a taxa de GFP + para as relações 1:1 e 1:10 foram consideradas baixas quando comparadas a relação 1:20 ($P < 0,001$). Possivelmente, nos complexos onde a concentração de MWCNT-COOH foi menor os embriões incorporaram poucas moléculas do gene GFP e não foram eficientemente transfectados.

Tabela 7 – Porcentagem de embriões GFP positivos (GFP+) 72 horas pós-transfecção com concentrações diferentes de MWCNT-COOH conjugados aos pGFP

N	Grupos	GFP+ (%)
30	MWCNT-COOH:pGFP (1:1)	3,33 ^a
30	MWCNT-COOH:pGFP (10:1)	3,33 ^a
30	MWCNT-COOH: pGFP (20:1)	46,67 ^b

Os valores estão demonstrados na forma de porcentagem. Letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente de acordo com o teste *Student Newman Keus* (SNK) ao nível de 5%.

A inovação no uso de NTC como carreadores gênicos para embriões bovinos consiste na sua capacidade de transpor a zona pelúcida, já evidenciada em trabalhos utilizando MWCNT não funcionalizado (PEREIRA et al., 2010b). No presente estudo, essa capacidade

foi mantida mesmo em MWCNT funcionalizados (MWCNT-COOH) após a complexação com o DNA plasmidial. A remoção da zona pelúcida, necessária para a maioria das outras técnicas disponíveis, pode prejudicar o desenvolvimento embrionário (BRONSON e MCLAREN 1970; RIBAS et al., 2006). Assim, o diferencial na utilização de MWCNT-COOH como carreadores de genes de interesse consiste na simplicidade e rapidez deste novo sistema de entrega gênica. Adicionalmente, os métodos tradicionais para este fim, como microinjeção ou carreadores virais requerem procedimentos complexos, equipamentos caros ou preocupações com relação à biossegurança. Com o uso dos complexos MWCNT-COOH:pGFP, a principal limitação consiste no número de estruturas disponíveis para o procedimento, uma vez que com este sistema vários embriões podem ser transfectados ao mesmo tempo, apenas com a adição da solução de NTCs complexados aos plasmídeos no meio de cultura embrionário.

Por outro lado, os resultados demonstraram que a expressão do transgene não foi mantida até o estágio de blastocisto, fato que pode ter sido relacionado ao tipo de plasmídeo utilizado ou as dificuldades comumente encontradas nos métodos de transgenia. Assim, novos estudos devem ser realizados para aperfeiçoar o uso de NTCs como carreadores gênicos em embriões, visto que além da sua capacidade de transpor a zona pelúcida, o uso destes materiais é promissor, pois dispensa o uso de equipamentos especializados o que pode futuramente diminuir o custo de produção de animais transgênicos.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os experimentos de 1, 2 e 3 foram delineados para avaliar os possíveis efeitos tóxicos das NFC e MWCNT em diferentes modelos biológicos. Nas condições testadas, os NMs não alteraram a viabilidade de fibroblastos em baixas concentrações, porém houve diminuição da viabilidade a partir de determinadas concentrações. Com relação aos embriões, na concentração avaliada, os NMs não alteraram a cinética de desenvolvimento e sobrevivência embrionária, porém, os MWCNT-COOH influenciaram maiores modificações na expressão gênica quando comparados às NFCs. Todavia, pesquisas futuras são necessárias para determinar os mecanismos pelos quais os NMs induzem a citotoxicidade nesses modelos biológicos.

Nos estudos de ecotoxicidade, de maneira geral, a exposição dos NMs desencadeou toxicidade em microalgas *C. vulgaris* e *K. flaccidum* após avaliação de vários parâmetros biológicos. As diferenças identificadas entre a toxicidade observada em meio de cultura e água do Rio Sena sugere que a toxicidade dos NMs possa ser “meio dependente”, o que leva a necessidade de pesquisas futuras com esse enfoque. Uma vez que a composição da água é diferente nas diferentes bacias hídricas do planeta.

No experimento 4, explorou-se o uso potencial de MWCNT-COOHs na transferência gênica para células e embriões de bovinos cultivados *in vitro*. Os MWCNT-COOH complexados aos plasmídeos marcados com GFP foram capazes de transfectar fibroblastos e embriões bovinos. Porém, novos estudos devem ser realizados para aumentar a eficiência de transfecção e a manutenção de genes exógenos nesses modelos.

Em conjunto, os resultados do presente estudo podem auxiliar na melhor compreensão da interferência de NMs em organismos vivos, uma vez que são escassas as informações acerca dos impactos das NFCs e dos MWCNTs na saúde humana e ambiental. Esses dados, em conjunto com outras pesquisas desenvolvidas em outros centros permitirão suportar atividades futuras sobre a recomendação de uso seguro desses NMs, ou reorientar estudos em andamento para melhor adequar o desenvolvimento de NMs. Com relação a aplicação de NMs como novos sistemas de entrega de genes, os dados de transfecção com os MWCNT-COOHs podem estimular mais pesquisas para aperfeiçoar este método de carregamento gênico, abrindo novas possibilidades de uso terapêutico bem como a produção de animais transgênicos.

REFERÊNCIAS

- ABE, K.; IWAMOTO, S.; YANO, H. Obtaining cellulose nanofibers with a uniform width of 15nm from wood. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 10, p. 3276-3278, set 2007.
- ABRAHAM, E. et al. X-ray diffraction and biodegradation analysis of green composites of natural rubber/nanocellulose. **Polym. Degrad. Stab.**, v. 97, p. 2378-2387, nov 2012.
- AHAMED, M. Toxic response of nickel nanoparticles in human lung epithelial A549 cells. **Toxicol. In Vitro**, v.25, n.4, p. 930-936, jun 2011.
- AHMED, F. E. Molecular markers for early câncer detection. **J. Environ. Sci. Health C Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.**, v.18, p.75-125, nov 2000.
- AHMED, M. et al. Cationic glyco-functionalized single-walled carbon nanotubes as efficient gene delivery vehicles. **Bioconjug. Chem.**, v.20, p. 2017-2022, nov 2009.
- AILLON, K. L. et al. Effects of nanomaterial physicochemical properties on in vivo toxicity. **Adv. Drug. Deliv. Rev.**, n. 61, p. 457-466, jun 2009.
- ARORA, S.; RAJWADE, J. M.; PAKNIKAR, K. M. Nanotoxicology and in vitro studies: the need of the hour. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 258, n.2, p.151-165, dez 2012
- ARUOJA, V. et al. Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. **Sci. Total Environ.**, v. 407, n. 4, p.1461-1468, nov 2009.
- AZEREDO, H. M. C. et al. Nanocellulose reinforced chitosan composite films as affected by nanofiller loading and plasticizer content. **J. Food Sci.**, v. 75, p. N1-N7, jan-fev 2010.
- AZIZI SAMIR, M. A.; ALLOIN, F.; DUFRESNE, A. Review of recent research into cellulosic whiskers, their properties and their application in nanocomposite field. **Biomacromolecules**, v. 6, p. 612-626, mar 2005
- BALDASSARRE, H. et al. Effect of GnRH injection timing in the production of pronuclear-stage zygotes used for DNA microinjection. **Zygote**, v. 12, p. 257-261, ago 2004
- BARDI, G. et al. Pluronic-coated carbon nanotubes do not induce degeneration of cortical neurons in vivo and in vitro. **Nanomedicine**, v.5, p. 96-104, mar 2009.
- BAUM, C. et al. An optimized electroporation protocol applicable to a wide range of cell lines. **Bio. Techniques**, v. 17, p. 1058-1060, dez 1994
- BAUN, A. et al. Ecotoxicity of engineered nanoparticles to aquatic invertebrates: a brief review and recommendations for future toxicity testing. **Ecotoxicology**, v. 17, p. 387-395, abr 2008.
- BAUMANN, C. G. et al. The quiet embryo hypothesis: molecular characteristics favoring viability. **Mol. Reprod. Dev.**, v.74, p. 1345-1353, out 2007.

BAVEYE, P.; LABA, M. Aggregation and toxicology of titanium dioxide nanoparticles. **Environ. Health Perspect.**, v. 116, n.4, p. 152-153, abr 2008.

BERHANU, D. et al. Characterisation of carbon nanotubes in the context of toxicity studies. **Environ. Health**, n.8, dez 2009

BHUNIA, K.; DHAWAN, S.; SABLANI, S. S. Modeling the oxygen diffusion of nanocomposite-based food packaging films. **J. Food Sci.**, v. 77, n. 7, p.29-38, jul 2012.

BIANCO, A.; KOSTARELOS, K.; PRATO, M. Applications of carbon nanotubes in drug delivery. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v.9, p. 674-679, dez 2005.

BIDDLESTONE-THORPE, L. et al. Nanomaterial-mediated CNS delivery of diagnostic and therapeutic agents. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 64, n. 7, p. 605-613, maio 2012.

BLAISE, C. et al. Ecotoxicity of selected nano-materials to aquatic organisms. **Environ. Toxicol.**, v. 23, n. 5, p. 591-598, out 2008.

BOLZINGER, M. A. et al. Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane. **Curr. Opin. Colloid. Interface Sci.**, v. 17, n. 3, p. 156-165, jun 2012.

BORM, P. J. et al. The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC. **Part. Fibre Toxicol.**, v. 3, n. 11, 2006.

BOTTINI, M. et al. Multi-walled carbon nanotubes induce T lymphocyte apoptosis. **Toxicol. Lett.**, v. 160, p. 121-126, jan 2006.

BOUSSIF, O. et al. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 92, n. 16, p. 7297-7301, ago 1995.

BRAYNER, R. et al. ZnO nanoparticles: synthesis, characterization, and ecotoxicological studies. **Langmuir**, v. 26, n. 9, p. 6522-6528, maio 2010.

BRONSON, R. A.; MCLAREN, A. Transfer to the mouse oviduct of eggs with and without the zona-pellucida. **J. Reprod. Fertil.**, v. 22, n.1, p. 129-137, jun 1970.

BRUGÈ, F. et al. Nanostructured lipid carriers loaded with Coq10: Effect on human dermal fibroblasts under normal and UVA-mediated oxidative conditions. **Int. J. Pharm.**, v. 455, n.1-2, p. 348-356, out 2013.

BUSSY, C. et al. Critical role of surface chemical modifications induced by length shortening on multi-walled carbon nanotubes-induced toxicity. **Part Fibre Toxicol.**, v. 27, p. 9-46, nov 2012.

BUZEA, C.; BLANDINO, I. I. P.; ROBBIE, K. Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. **Biointerphases**, v. 2, n. 4, p.MR17 - MR172, dez 2007

- BYSTRZEJEWSKA-PIOTROWSKA, G.; GOLIMOWSKI, J.; URBAN, P. L. Nanoparticles: their potential toxicity, waste and environmental management. **Waste Manag.**, v. 29, n.9, p. 2587-2595, set 2009.
- CAI, D. et al. Highly efficient molecular delivery into mammalian cells using carbon nanotube spearing. **Nat. Methods**, v. 2, n.6, p. 449-454, jun 2005.
- CAI, D. et al. Interaction between carbon nanotubes and mammalian cells: characterization by flow cytometry and application. **Nanotechnology**, v. 19, n.34, p.1-10, ago 2008.
- CAMARGO, L. S. A. et al. Factors influencing in vitro embryo production. **Anim. Reprod.**, v. 3, n.1, p. 19-28, jan-mar 2006.
- CANCINO, J. et al. In vitro nanotoxicity of single-walled carbon nanotube-dendrimer nanocomplexes against murine myoblast cells. **Toxicol. Lett.**, v. 219, n.1, p.18-25, maio 2013.
- CARNEIRO, K. et al. Histone deacetylase activity is necessary for left-right patterning during vertebrate development. **BMC Dev. Biol.**, v. 11, n. 29, maio 2011.
- CASEY, A. et al. Single walled carbon nanotubes induce indirect cytotoxicity by medium depletion in A549 lung cells. **Toxicol. Lett.**, v. 179, n. 2, p. 78-84, Jun 2008.
- CHAMPION; J.A.; MITRAGOTRI, S. Role of target geometry in phagocytosis. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 103, n. 13, p. 4930-4934, mar 2006.
- CHANCHAM, P.; HUGHES, J. A. Relationship between plasmid DNA topological forms and in vitro transfection. **J. Liposome Res.**, v. 11, n. 2-3, p. 139-52, set 2001.
- CHEN, S. C. et al. Effects of engineered nanoparticles on the assembly of exopolymeric substances from phytoplankton **PLoS One**, v. 6, n. 7, p. e21865, jul 2011.
- CHEN, H. et al. Multifaceted applications of nanomaterials in cell engineering and therapy. **Biotechnol. Adv.**, v.31, n. 5, p. 638-653, ago 2012.
- CHENG, L. et al. GFP reporter system to assess gene transfer and expression in human hematopoietic progenitor cells. **Gene Therapy**, v. 4, n.10, p. 1013-1022, out 1997.
- CHENG, J.; FLAHAUT, E.; CHENG, S. H. Effect of Carbon nanotubes on enveloping Zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 26, n.4, p. 708-716, abr 2007.
- CHENG, J. et al. Acute and long-term effects after single loading of functionalized multi-walled carbon nanotubes into Zebrafish (*Danio rerio*). **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 235, n.2, p. 216-225, mar 2009.
- CHENG, W.W. et al. Single-walled carbon nanotube induction of rat aortic endothelial cell apoptosis: Reactive oxygen species are involved in the mitochondrial pathway. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 43, n.4, p. 564-572, abr 2011.

- CHEUNG, L. C. et al. Nano–bio effects: interaction of nanomaterials with cells. **Nanoscale**, v. 5, n.9, p. 3547-3569, maio 2013.
- CHEUNG, W. et al. DNA and carbon nanotubes as medicine. **Adv. Drug Deli. Rev.**, v.62, n. 6, p. 633-649, abr 2010.
- CHIRINO, Y. I. et al. PM₁₀ impairs the antioxidant defense system and exacerbates oxidative stress driven cell death. **Toxicol. Lett.**, v. 193, n. 3, p. 209-216, jan 2010.
- CHRISTOPHE, M.; NICOLAS, S. Mitochondria: a target for neuroprotective interventions in cerebral ischemia-reperfusion. **Curr. Pharm. Des.**, v. 12, n. 6, p. 739-757, fev 2006.
- CICCHETTI, R. et al. Effects of single-wall carbon nanotubes in human cells of the oral cavity: geno-cytotoxic risk. **Toxicol. In Vitro**, v. 25, n.8, p. 1811-1819, dez 2011.
- CIOFANI, G. et al. Assessing cytotoxicity of boron nitride nanotubes: Interference with the MTT assay. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 394, n. 2, p. 405-411, abr 2010.
- CLEMENT, L. et al. Toxicity assessment of silica nanoparticles, functionalised silica nanoparticles, and HASE-grafted silica nanoparticles. **Sci. Total Environ.**, v. 450, p. 120-128, abr 2013.
- CLEUVERS, M.; WEYERS, A. Algal growth inhibition test: does shading of coloured substances really matter? **Water Res.**, v. 37, n. 11, p. 2718-2722, jun 2003.
- CLIFT, M. J. et al. Investigating the interaction of cellulose nanofibers derived from cotton with a sophisticated 3D human lung cell coculture. **Biomacromolecules**, v. 12, n. 10, p. 3666-3673, out 2011.
- CONNER, S. D.; SCHMID, S. L. Regulated portals of entry into the cell. **Nature**, v. 422, n. 6927, p. 37-44, mar 2003.
- COONROD, A.; LI, F. Q.; HORWITZ, M. On the mechanism of DNA transfection: efficient gene transfer without viruses. **Gene Ther.**, v. 4, n. 12, p. 1313-1321, dez 1997.
- CRESS, W. D.; SETO, E. Histone deacetylases, transcriptional control, and cancer. **J. Cell Physiol.**, v. 184, n.1, p.1-16, jul 2000.
- CUELLO, A. C. et al. Early-stage inflammation and experimental therapy in transgenic models of the Alzheimer-like amyloid pathology. **Neurodegener. Dis.**, v. 7, n. 1-3, p. 96-98, fev 2010.
- CUI, D. X. et al. Effect of single wall carbon nanotubes on human HEK293 cells. **Toxicol. Lett.**, v.155, n.1, p. 73-85, jan 2005.
- DAVOREN, M. et al. *In vitro* toxicity evaluation of single walled carbon nanotubes on human A549 lung cells. **Toxicol. In Vitro**, v. 21, n. 3, p. 438-448, abr 2007.

DAY, C. D. et al. Transgene integration into the same chromosome location can produce alleles that express at a predictable level, or alleles that are differentially silenced. **Genes Dev.**, v. 14, n. 22, p.2869-2880, nov 2000.

DELGADO, G. C. Economics and governance of nanomaterials: potential and risks. **Technol. Soc.**, v. 32, n.2, p. 137-144, maio 2010.

DELOGU, G. L. et al. Conjugation of antisense oligonucleotides to PEGylated carbon nanotubes enables efficient knockdown of PTPN22 in T lymphocytes. **Bioconjug. Chem.**, v. 20, n. 3, p. 427-431, mar 2009.

DENG, X. et al. Nanosized zinc oxide particles induce neural stem cell apoptosis. **Nanotechnology**, v. 20, n.11, p. 115101, mar 2009.

DHAWAN, A.; SHARMA, V.; PARMAR, D. Nanomaterials: a challenge for toxicologists. **Nanotoxicology**, v. 3, n. 1, p. 1-9, dez 2009.

DI GIORGIO, M. L. et al. Effects of single and multi walled carbon nanotubes on macrophages: cyto and genotoxicity and electron microscopy. **Mutat. Res.**, v. 722, n. 1, p. 20-31, maio 2011.

DING, L. et al. Molecular characterization of the cytotoxic mechanism of multiwall carbon nanotubes and nano-onions on human skin fibroblast. **Nano Lett.**, v. 5, n. 12, p. 2448-2464, dez 2005.

DONALDSON, K.; TRAN, C. L. An introduction to the short-term toxicology of respirable industrial fibres. **Mutat. Res.**, v. 553, n.1-2, p. 5-9, set 2004.

DONALDSON, K. et al. Carbon nanotubes: a review of their properties in relation to pulmonary toxicology and workplace safety. **Toxicol. Sci.**, v.92, n. 1, p. 5-22, jul 2006.

DONALDSON, K. et al. Asbestos, carbon nanotubes and the pleural mesothelium: a review of the hypothesis regarding the role of long fibre retention in the parietal pleura, inflammation and mesothelioma. **Part. Fibre Toxicol.**, v. 7, n. 5, mar 2010.

DONOVAN, D. M.; KERR, D. E.; WALL, R. J. Engineering disease resistant cattle, **Transgenic Res.**, v. 14, n.5, p. 563-567, out 2005.

DOSHI; N. MITRAGOTRI, S. Needle-shaped polymeric particles induce transient disruption of cell membranes. **J. R. Soc. Interface**, n. 7, p. 403-410, ago 2010.

DUFRESNE, A.; DUPEYRE, D.; VIGNON, M. R. Cellulose microfibrils from potato tuber cells: Processing and characterization of starch-cellulose microfibril composites. **J. Appl. Poly. Sci.**, v. 76, n. 14, p. 2080-2092, jun 2000.

DUFRESNE, A. Comparing the mechanical properties of high performances polymer nanocomposites from biological sources. **J. Nanosci. Nanotechnol.**, v.6, n.2, p. 322-330, fev 2006.

DUMORTIER, H. et al. Functionalized carbon nanotubes are non-cytotoxic and preserve the functionality of primary immune cells. **Nano Lett.**, v. 6, n. 7, p. 1522-1528, jul 2006.

DUNCAN, R. et al. Validation of tumour models for use in anticancer nanomedicine evaluation: the EPR effect and cathepsin B-mediated drug release rate. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v.72, n.2, p. 417-427, ago 2013.

EICHHORN, S. J. et al. Review: current international research into cellulose nanofibres and nanocomposites. **J. Mater. Sci.**, v. 45, p. 1-33, set 2010.

EKWALL, B. Overview of the final MEIC results: II. The in vitro/in vivo evaluation, including the selection of a practical battery of cell tests for prediction of acute lethal blood concentrations in humans. **Toxicol. in Vitro**, v. 13, n.4-5, p. 665-673, ago 1999.

ELSAESSER, A.; HOWARD, C.V. Toxicology of nanoparticles. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 64, n. 2, p. 129-137, fev 2012.

ENYASHIM, A. N.; GEMMING, S.; SEIFERT, G. DNA-wrapped carbon nanotubes, **Nanotechnology**, v. 18, n. 24, p. 702-703, fev 2007.

FANG, G. et al. Multiwalled carbon nanotubes as matrix solid-phase dispersion extraction absorbents to determine 31 pesticides in agriculture samples by gas chromatography-mass spectrometry. **J. Agric. Food Chem.**, v. 57, n.8, p. 3040-3045, abr 2009.

FARISS, M. W. et al. Role of mitochondria in toxic oxidative stress. **Mol. Interventions**, v. 5, n. 2, p. 94-111, abr 2005.

FEYNMAN, R. **Há mais espaços lá embaixo**. Caltech's Engineering and Science, 1960.

FISCHER, H. C.; CHAN, W. C. Nanotoxicity: the growing need for in vitro study. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 18, p. 565-571, 2007.

FRUM, T. et al. Oct4 cell-autonomously promotes primitive endoderm development in the mouse blastocyst. **Dev. Cell.**, v. 25, n. 6, p. 610-622, jun 2013.

FUJIWARA, Y. et al. Analysis of the flanking regions of the human α -lactalbumin gene responsible for position-effect independent expression. **Gene**, v. 305, n. 1, p. 71-78, fev 2003.

GAJEWICZ, A. et al. Advancing risk assessment of engineered nanomaterials: application of computational approaches. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 64, n. 15, p. 1663-1693, dez 2012.

GAO, H.; KONG, Y. Simulation of DNA-nanotube interactions. **Annu. Rev. Mater. Res.**, v. 34, p. 123-150, ago 2004.

GAO, H.; PANG, Z.; JIANG, X. Targeted delivery of nano-therapeutics for major disorders of the central nervous system. **Pharm. Res.**, v.30, n.10, p. 2485-2498, jun 2013.

GARNIER, C.; MOUNIER, S.; BENAÏM, J.Y. Influence of dissolved organic carbon content on modelling natural organic matter acid-base properties. **Water Res.**, v.38, n. 17, p. 3685-3692, out 2004.

GEIM, A. K.; NOVOSELOV, K. S. The rise of graphene. **Nat. Mater.**, v. 6, n.3, p. 183-191, mar 2007.

GIGLIOTTI, B. et al. Sequence-independent helical wrapping of single-walled carbon nanotubes by long genomic DNA. **Nano Lett.**, v. 6, n.2, p. 159-164, fev 2006.

GRIEGER, K. D. et al. Environmental benefits and risks of zero-valent iron nanoparticles (nZVI) for in situ remediation: risk mitigation or trade-off? **J. Contam. Hydrol.**, v. 118, n. 3-4, p. 165-183, nov 2010.

GROLL, A. V. **Lipídios catiônicos anfífilos como neutralizadores da carga elétrica do DNA para transfecção *in vitro* de células eucarióticas.** 2003. 102f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

GUO, L. et al. Adsorption of essential micronutrients by carbon nanotubes and the implications for nanotoxicity testing. **Small**, v. 4, n. 6, p. 721-727, jun 2008.

GUO, H. et al. Optimization of electrotransfection conditions of mammalian cells with different biological features. **J. Membr. Biol.**, v. 245, n. 12, dez 2012.

GUPTA, S. K. et al. Human zona pellucida glycoproteins: functional relevance during fertilization. **J. Reprod. Immunol.**, v. 83, n.1-2, p. 50-55, dez 2009.

GUPTA, A. et al. Single walled carbon nanotube composites for bone tissue engineering. **J. Orthop. Res.**, v. 31, n. 9, p. 1374-1381, set 2013.

HAGENS, W. I. et al. What do we (need to) know about the kinetic properties of nanoparticles in the body? **Regul. Toxicol. Pharmacol.**, v. 49, n.3, p. 217-219, dez 2007.

HALDER, D. et al. Chronic ethanol exposure increases gooseoid (GSC) expression in human embryonic carcinoma cell differentiation. **J. Appl. Toxicol.**, fev 2013.

HANDY, R. D.; OWEN, R.; VALSAMI-JONES, E. The ecotoxicology of nanoparticles and nanomaterials: current status, knowledge gaps, challenges, and future needs. **Ecotoxicology**, v. 17, n. 5, p. 315-325, jul 2008.

HANIU, H. et al. Culture medium type affects endocytosis of multi-walled carbon nanotubes in BEAS-2B cells and subsequent biological response. **Toxicol. In Vitro.**, v.27, n. 6, p. 1679-1685, set 2013.

HARALD, K. et al. Human and ecotoxicity of synthetic nanomaterials. Initial insights for major accident prevention. Federal Office for the Environment, Bern. **Environ. Studies**, n. 1301, p. 44, 2013

- HARDY, K. Cell death in the mammalian blastocyst. **Mol. Hum. Reprod.**, v. 3, p. 919-925, 1997
- HEISTER, E. et al. Higher dispersion efficacy of functionalized carbon nanotubes in chemical and biological environments. **ACS Nano**, v. 4, n.5, p. 2615-2626, maio 2010.
- HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v.407, n. 6805, p. 770-776, out 2000.
- HENRIKSSON, M. et al. Cellulose nanopaper structures of high toughness **Biomacromolecules**, v. 9, n.6, p. 1579-1585, jun 2008.
- HERR, U. et al. Near-field effects and energy transfer in hybrid metal-oxide nanostructures. **Beilstein J. Nanotechnol.**, v. 4, p. 306-317, maio 2013.
- HIROSE, S.; TSUDA, M.; SUZUKI, Y. Enhanced Transcription of Fibroin Gene. **J. Biol. Chem.**, v. 260, n. 19, p. 10557-10562, set 1985.
- HOFMANN, A. et al. Generation of transgenic cattle by lentiviral gene transfer into oocytes. **Biol. Reprod.**, v. 71, n. 2, p. 405-409, ago 2004.
- HOFMANN, A. et al. Epigenetic regulation of lentiviral transgene vectors in a large animal model. **Mol. Ther.**, v. 13, n. 1, p. 59-66, jan 2006.
- HOUDEBINE, L. M. Use of transgenic animals to improve human health and animal production. **Reprod. Domest. Anim.**, v. 40, n. 4, p. 269-281, ago 2005.
- HU, Y. L. et al. Toxicity evaluation of biodegradable chitosan nanoparticles using a zebrafish embryo model. **Int. J. Nanomed.**, v. 6, p. 3351-3359, dez 2011.
- HUANG, Y. W.; WU, C. H.; ARONSTAM, R. S. Toxicity of transition metal oxide nanoparticles: recent insights from in vitro studies. **Materials**, v. 3, n. 10, p. 4842-4859, out 2010.
- HUANG, Y. P. et al. Delivery of small interfering RNAs in human cervical cancer cells by polyethylenimine-functionalized carbon nanotubes. **Nanoscale Res. Lett.**, v. 8, n.1, p. 267, jun 2013.
- HUSSAIN, S. M. et al. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. **Toxicol. In Vitro**, v. 19, n. 7, p. 975-983, out 2005.
- IJIMA, S. Helical microtubules of graphitic carbon. **Nature**, v.354, n. 6348, p. 56-58, nov 1991.
- INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION (ISO). ISO 10253. Water quality- Marine Algae Growth Inhibition test with *Skeletonema costatum* and *Phaeodactylum tricorutum*. Geneva ,1995.

INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION (ISO). ISO/TS 27687:

Nanotechnologies - Terminology and definitions for nano-objects - Nanoparticle, nanofibre and nanoplate. Geneva, 2008.

INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION (ISO). ISO 10993-5 - Biological evaluation of medical devices. Part 5: tests for cytotoxicity: in vitro methods. Geneva, 2009.

ISHII, T. et al. Induction of murine intestinal and hepatic peroxiredoxin MSP23 by dietary butylated hydroxyanisole. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 5, p. 1013-1016, maio 2000.

JAGADEESAN, D.; ESWARAMOORTHY, M. Functionalized Carbon Nanomaterials Derived from Carbohydrates. **Chem. Asian J.**, v. 5, n.2, p. 232- 243, fev 2010.

JANG, J.; LIM, D.; CHOI, I. The impact of nanomaterials in immune system. **Immune Netw.**, v. 10, n. 3, p. 85-91, jun 2010.

JIA, G. et al. Cytotoxicity of carbon nanomaterials: single-wall nanotube, multi-wall nanotube, and fullerene. **Environ. Sci. Technol.**, v. 39, n. 5, p. 1378-1383, mar 2005.

JIANG, J.; OBERDÖRSTER, G.; BISWAS, P. Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. **J. Nanopart. Res.**, v. 11, n. 1, p. 77-89, jun 2009.

JIANG, Y. et al. Modulation of apoptotic pathways of macrophages by surface-functionalized multi-walled carbon nanotubes. **PLoS One**, v. 8, n. 6, p. e65756, Jun 2013.

JORDAN, E. T. et al. Optimizing electroporation conditions in primary and other difficult-to-transfect cells. **J. Biomol. Tech.**, v. 19, n.5, p. 328-334, dez 2008.

JOSHI, R.P.; SCHOENBACH, K. H. Mechanism for membrane electroporation irreversibility under high-intensity, ultrashort electrical pulse conditions. **Phys. Rev. E Stat. Nonlin. Soft Matter. Phys.**, v. 66, n. 5, p. 052901, nov 2002.

JOVINE, L. et al. Zona pellucida domain proteins. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 74, p. 83-114, jul 2005.

KAGAN, V. E.; BAYIR, H.; SHVEDOVA, A. A. Nanomedicine and nanotoxicology: two sides of the same coin. **Nanomedicine**, v. 1, n. 4, p. 313-316, dez 2005.

KAM, S. W. N.; LIU, Z.; DAI, H. Carbon nanotubes as intracellular transporters for proteins and DNA: an investigation of the uptake mechanism and pathway. **Angew. Chem. Int. Ed. Eng.**, v. 45, n.4, p. 577-581, jan 2006.

KAMSTOCK, D. et al. Liposome-DNA complexes infused intravenously inhibit tumor angiogenesis and elicit antitumor activity in dogs with soft tissue sarcoma. **Cancer Gene Ther.**, v. 13, n. 3, p. 306-317, mar 2006.

KARTHIKEYAN, S.; MAHALINGAM, P.; KARTHIK, M. Large scale synthesis of carbon nanotubes. **E. J. Chem.**, v.6, n.1, p. 1-12, set 2009.

KELLER, A. A. et al. Stability and aggregation of metal oxide nanoparticles in natural aqueous matrices. **Environ. Sci. Technol.**, v. 44, n. 6, p. 1962-1967, mar 2010.

KELLY, R. J. Occupational medicine implications of engineered nanoscale particulate matter. **J. Chem. Health Safe.**, p.1-42, maio 2008.

KHODAKOVSKAYA, M. et al. Carbon nanotubes are able to penetrate plant seed coat and dramatically affect seed germination and plant growth. **ACS Nano**, v. 3, n. 10, p. 3221-3227, out 2009.

KIDDER, B. L.; PALMER, S. HDAC1 regulates pluripotency and lineage specific transcriptional networks in embryonic and trophoblast stem cells. **Nucleic Acids Res.**, v. 40, n. 7, p. 2925-2939, abr 2012.

KIM, S. et al. Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells. **Toxicol. In Vitro**, v. 23, n. 6, p. 1076-1084, set 2009.

KIRCHHOF, N. et al. Expression pattern of oct-4 in preimplantation embryos of different species. **Biol. Reprod.**, v. 63, n. 6, p 1698-1705, dez 2000.

KISIN, E. R. et al. Genotoxicity of carbon nanofibers: are they potentially more or less dangerous than carbon nanotubes or asbestos? **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 252, n. 1, p. 1-10, abr 2011.

KOLAKOVIC, R. et al. Spray-dried cellulose nanofibers as novel tablet excipient. **AAPS PharmSciTech**, v.12, n. 4, p. 1366-1373, dez 2011.

KOSTARELOS, K. The long and short of carbon nanotube toxicity. **Nat. Biotechnol.**, v. 26, n. 7, p. 774-776, jul 2008.

KROTO, H. The 2009 Lindau nobel laureate Meeting: Sir Harold Kroto, Chemistry 1996. **J. Vis. Exp.**, v. 7; n. 38, p. 1576, abr 2010.

KYRYLKOVA, K. et al. Detection of apoptosis by TUNEL assay. **Methods Mol. Biol.**, v. 887, p. 41-47, 2012.

KWOK, K. W. et al. Chronic toxicity of double-walled carbon nanotubes to three marine organisms: influence of different dispersion methods. **Nanomedicine**, v. 5, n. 6, p. 951-961, ago 2010.

LADEIRA, M. S. Highly efficient siRNA delivery system into human and murine cells using single-wall carbon nanotubes. **Nanotechnology**, v. 21, n. 38, p. 385101, set 2010.

LEE, Y.; GECKELER, K. E. Carbon nanotubes in the biological interphase: the relevance of noncovalence. **Adv. Mater.**, v. 22, n. 36, p. 4076-4083, set 2010.

LEE, Y. S. et al. Silver nanoparticles induce apoptosis and G2/M arrest via PKC ζ -dependent signaling in A549 lung cells. **Arch.Toxicol.**, v. 85, n.12, p. 1529-1540, dez 2011.

- LEIDENFROST, S. et al. Cell arrest and cell death in mammalian preimplantation development: lessons from the bovine model. **PLoS One**, v. 6, n. 7, p. e22121, jul 2011.
- LESAGE, D. et al. Evaluation and optimization of DNA delivery into gliosarcoma 9L cells by a cholesterol-based cationic liposome. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1564, n. 2, p. 393-402, ago 2002.
- LEWINSKI, N.; COLVIN, V.; DREZEK, R. Cytotoxicity of nanoparticles. **Small**, v. 4, n.1, p. 26-49, jan 2008.
- LI, B. et al. Pathways of induction of peroxiredoxin I expression in osteoblasts: roles of p38 mitogen-activated protein kinase and protein kinase C. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 14, p. 12418-12422, abr 2002.
- LI, Q. et al. The incorporation of daunorubicin in cancer cells through the use of titanium dioxide whiskers. **Biomaterials**, v. 30, n. 27, p. 4708-4715, set 2009.
- LI, Z.; WU, Z.; LI, K. The high dispersion of DNA–multiwalled carbon nanotubes and their properties. **Anal Biochem.**, v. 387, n. 2, p. 267-270, abr 2009.
- LIM, J. H. et al. Evaluation of maternal toxicity in rats exposed to multi-wall carbon nanotubes during pregnancy. **Environ. Health Toxicol.**, v. 26, p. e2011006, abr 2011.
- LIMA, R. et al. **Int. J. Nanomedicine**, v.7, p. 3555-3565, jul 2012.
- LING, M. P. et al. Risk management strategy to increase the safety of workers in the nanomaterials industry. **J. Hazard Mater.**, v. 229-230, p. 83-93, ago 2012.
- LIU, Y. et al. Polyethylenimine-grafted multiwalled carbon nanotubes for secure noncovalent immobilization and efficient delivery of DNA. **Angew. Chem. Int. Engl.**, v.44, n. 30, p. 4782-4785, jul 2005.
- LIU, C. J. et al. Preparation and characterization of nanomaterials for sustainable energy production. **ACS Nano**, v. 4, n. 10, p. 5517-5526, out 2010a.
- LIU, J. M. et al. A new phosphorimetry for the determination of trace alkaline phosphatase using multi-wall carbon nanotubes and its diagnosis of human diseases. **J. Fluoresc.**, v. 20, n. 4, p.933-941, jul 2010b.
- LIU, M. et al. Polyamidoamine-grafted multiwalled carbon nanotubes for gene delivery: synthesis, transfection and intracellular trafficking. **Bioconjug. Chem.**, v. 22, n. 11, p. 2237-2243, nov 2011.
- LIU, D. et al. Different cellular response mechanisms contribute to the length-dependent cytotoxicity of multi-walled carbon nanotubes. **Nanoscale Res. Lett.**, v. 7, n. 1, p. 361, jul 2012.
- LIU, X. et al. Biocompatible multi-walled carbon nanotube-chitosan–folic acid nanoparticle hybrids as GFP gene delivery materials. **Colloids Surf. B.**, v. 111, p.224-231, jun 2013.

- LOVE, S. A. et al. Assessing nanoparticle toxicity. **Annu. Rev. Anal. Chem.**, v. 5, n. 563, p. 181-205, abr 2012.
- LU, Z. et al. Effect of particle shape on phagocytosis of CdTe quantum dot–cystinecomposites. **Med. Chem. Commun.**, v. 1, p. 84-86, abr 2010.
- MA, W.; YANG, X.; LIANG, X. Obesity does not aggravate vitrification injury in mouse embryos: a prospective study **Reprod. Biol. Endocrinol.**, v. 10, n. 68, ago 2012
- MAGREZ, A. et al. Cellular toxicity of carbon-based nanomaterials. **Nano Lett.**, v. 6, n. 6, p. 1121-1125, jun 2006.
- MAHMOOD, M. et al. Cytotoxicity and biological effects of functional nanomaterials delivered to various cell lines. **J. Appl. Toxicol.**, v. 30, n. 1, p. 74-83, jan 2010.
- MENG, L. et al. Short multiwall carbon nanotubes promote neuronal differentiation of pc12 cells via up-regulation of the neurotrophin signaling pathway. **Small**, n. 9, v.9-10, p. 1786-1798, maio 2013.
- MAUCKSCH, C. et al. Transgene expression of transfected supercoiled plasmid DNA concatemers in mammalian cells. **J. Gene Med.**, n. 11, v. 5, p. 444-453, maio 2009.
- MAYNARD, A. D. et al. Exposure to carbon nanotube material: aerosol release during the handling of unrefined single-walled carbon nanotube material. **J. Toxicol. Environ. Health A**, v. 67, n. 1, p. 87-107, jan 2004.
- METZLER, D. M. et al. Responses of algal cells to engineered nanoparticles measured as algal cell population, chlorophyll a, and lipid peroxidation: effect of particle size and type. **J. Nanotechnol.**, jul 2012.
- MIAO, A. J et al. The algal toxicity of silver engineered nanoparticles and detoxification by copolymeric substances. **Environ. Pollut.**, v. 157, n. 11, p. 3034-3041, nov 2009.
- MINTZER, M. A.; SIMANEK, E. E. Nonviral vectors for gene delivery. **Chem. Rev.**, v. 109, n. 2, p. 259-302, fev 2009.
- MIHRANYAN, A.; FERRAZ, N.; STRØMME, M. Current status and future prospects of nanotechnology in cosmetics. **Prog. Mater. Sci.**, v. 57, n. 5, p. 875-910, out 2012.
- MITTERMEYER, G. et al. Long-term evaluation of a phase 1 study of AADC gene therapy for Parkinson's disease. **Hum. Gene Ther.**, v. 23, n. 4, p.377-381, abr 2012.
- MITSUI, K. et al. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. **Cell**, v. 113, n. 5, p. 631-642, maio 2003.
- MOHANTYA, A. K.; MISRA, M.; HINRICHSEN, G. Biofibres, biodegradable polymers and biocomposites: An overview. **Macromol. Mater. Eng.**, v. 276-277, n.1, p.1-24, maio 2000.

MOISYADI, S.; KAMINSKI, J. M.; YANAGIMACHI, R. Use of intracytoplasmic sperm injection (ICSI) to generate transgenic animals. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 32, n. 2, p. 47-60, mar 2009.

MOON, R. J. et al. Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites. **Chem. Soc. Rev.**, v. 40, n. 7, p. 3941-3994, maio 2011.

MOREIRA, S. et al. BC nanofibres: in vitro study of genotoxicity and cell proliferation. **Toxicol. Lett.**, v. 189, n. 3, p. 235-241, set 2009.

MOUROT, M. et al. The influence of follicle size, FSH-enriched maturation medium, and early cleavage on bovine oocyte maternal mRNA levels. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 73, n. 11, p.1367-1379, nov 2006.

MURDOCK, R. C. et al. Characterization of nanomaterial dispersion in solution prior to in vitro exposure using dynamic light scattering technique. **Toxicol. Sci.**, v. 101, n. 2, p. 239-253, fev 2008.

NAIR, R. et al. Nanoparticulate material delivery to plants. **Plant. Sci.**, v. 179, p. 154-163, maio 2010.

NAVARRO, E. et al. Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. **Ecotoxicology**, v. 17, n. 5, p. 372-386, jul 2008.

NAYDENOV, B.; BOLAND, J. J. Engineering the electronic structure of surface dangling bond nanowires of different size and dimensionality. **Nanotechnology**, v. 24, n. 27, p. 275202, jul 2013.

NEAGOE, I. B. et al. Efficient siRNA delivery system using carboxylated single-wall carbon nanotubes in cancer treatment. **J. Biomed. Nanotechnol.**, v. 8, n. 4, p. 567-574, ago 2012.

NEL, A. et al. Toxic potential of materials at the nanolevel. **Science**, v. 311, p. 622-627, fev 2006.

NEL, A. E. et al. Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface. **Nat. Mater.**, v. 8, n. 7, p. 543-557, jul 2009.

NEUBER, E. Analysis of DNA fragmentation of in vitro cultured bovine blastocysts using TUNEL. **Theriogenology**, v. 57, n. 9, p. 2193-2202, jun 2002.

NIAKAN, K. K.; EGGAN, K. Analysis of human embryos from zygote to blastocyst reveals distinct gene expression patterns relative to the mouse. **Dev. Biol.**, v. 375, n. 1, p. 54-64, mar 2013.

NISHINO, T.; MATSUDA, I.; HIRAO, K. All-cellulose composite. **Macromolecules**, v. 37, n. 20, p. 7683-7687, set 2004.

NOHYNEK, G. J. e DUFOUR, E. **Nanotechnology in cosmetics and sunscreens: is there a health risk??** Congrès de la SFT, Paris. (2008).

NUNES, A. et al. Hybrid polymer-grafted multiwalled carbon nanotubes for in vitro gene delivery. **Small**, v. 6, n. 20, p. 2281-2291, out 2010.

OBERDORSTER, G. et al. Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. **Inhal. Toxicol.**, v.16, n. 6-7, p. 437-445, jun 2004.

OBERDORSTER, G.; OBERDORSTER, E.; OBERDORSTER, J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. **Environ. Health Perspect.**, v.113, n. 7, p. 823-839, jul 2005a.

OBERDORSTER, G. et al. Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. **Part. Fibre Toxicol.**, v. 2, p. 8-43, out 2005b.

O'CONNELL, M. J. et al. Reversible water-solubilization of single-walled carbon nanotubes by polymer wrapping. **Chem. Phys. Lett.**, v. 342, n. 3-4, p.265-271, jul 2001.

OKUDA-SHIMAZAKI, J. et al. Effects of titanium dioxide nanoparticle aggregate size on gene expression. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 11, n. 6, p. 2383-2392, jun 2010.

ORTS, W. J.; et al. Application of cellulose microfibrils in polymer nanocomposites. **J. Polym. Environ.**, v. 13, n. 4, p. 301-306, out 2005.

PACURARI, M. Cell permeability, migration, and reactive oxygen species induced by multiwalled carbon nanotubes in human microvascular endothelial cells. **J. Toxicol. Environ. Health A.**, v.75, n. 3, p. 129-147, jan 2012.

PANT, D.; KEEFER, C. L. Expression of pluripotency-related genes during bovine inner cell mass explant culture. **Cloning Stem Cells**, v. 11, n. 3, p. 355-365, set 2009.

PANTAROTTO, D. et al. Functionalized carbon nanotubes for plasmid DNA gene delivery. **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.**, v. 43, n. 39, p. 5242-5246, out 2004.

PARK, E. J. et al. Oxidative stress and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. **Toxicol. Lett.**, v. 180, p. 222-229, ago 2008.

PARRISH, J. J.; KROGENAES, A.; SUSKO-PARRISH, J. L. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. **Theriogenology**, v. 44, p. 859-869, out 1995.

PATLOLLA, A.; PATLOLLA, B.; TCHOUNWOU, P. Evaluation of cell viability, DNA damage, and cell death in normal human dermal fibroblast cells induced by functionalized multiwalled carbon nanotube. **Mol. Cell Biochem.**, v. 338, n. 1-2, p. 225-232, maio 2010.

PATIL, S. et al. Protein adsorption and cellular uptake of cerium oxide nanoparticles as a function of zeta potential. **Biomaterials**, v. 28, n. 31, p. 4600-4607, nov 2007.

PATIL, M. L. et al. Surface-modified and internally cationic polyamidoamine dendrimers for efficient sirna delivery. **Bioconjug. Chem.**, v.19, n. 7, p. 1396-1403, jul 2008.

- PEREIRA, M. M. et al. Effect of oxygen tension and serum during IVM on developmental competence of bovine oocytes. **Rep. Fert. Dev.**, v. 22, n. 7, p. 1074-1082, ago 2010a.
- PEREIRA, M. M. et al. Identification of the presence of carbon nanotubes in bovine embryo by Raman spectroscopy. In: NANOAGRI, 2010, São Pedro. International Conference on Food and Agriculture Applications of Nanotechnologies, v. 1. p. 248-248, 2010b.
- PEREIRA, M. M. et al. Gene expression and apoptosis in bovine preimplantation embryo exposed to carbon nanotubes. In: NANOAGRI, 2010, São Pedro. International Conference on Food and Agriculture Applications of Nanotechnologies, 2010c. v. 1. p. 238-238.
- PERSSON, H. et al. Fibroblasts cultured on nanowires exhibit low motility, impaired cell division, and DNA Damage. **Small**, jun 2013.
- PETKOVIC, J. et al. DNA damage and alterations in expression of DNA damage responsive genes induced by TiO₂ nanoparticles in human hepatoma HepG2 cells. **Nanotoxicology**, v. 5, n. 3, p. 341-353, set 2011.
- PFAFFL, M. W.; HORGAN, G. W.; DEMPFLER, L. relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Res.**, v. 30, n. 9, p. 26-36, maio 2002.
- PHENRAT, T. et al. Partial oxidation (“aging”) and surface modification decrease the toxicity of nanosized zerovalent iron. **Environ. Sci. Technol.**, v. 43, n. 1, p. 195-200, jan 2009.
- PIETROIUSTI, A. et al. Low doses of pristine and oxidized single-wall carbon nanotubes affect mammalian embryonic development. **ACS Nano**, v. 5, n. 6, p. 4624-4633, jun 2011.
- PISTOCCHI, R. et al. Increased production of extra- and intracellular metal-ligands in phytoplankton exposed to copper and cadmium. **J. Appl. Phycol.**, v. 12, n. 3-5, p. 469-477, abr 2000.
- POLAND, C. A. et al. Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study. **Nat Nanotechnol**, v. 3, n. 7, p. 423-428, jul 2008.
- POWELL, A. M. et al. Cell donor influences success of producing cattle by somatic cell nuclear transfer. **Biol. Reprod.**, v. 71, n.1, p. 210-216, jul 2004
- POWERS, K.W. et al. Characterization of the size, shape, and state of dispersion of nanoparticles for toxicological studies. **Nanotoxicology**, v. 1, n. 1, p. 42-51, jan 2007.
- PRAZERES, D. M. F.; SCHLUEP, T. COONEY, C. Preparative purification of supercoiled plasmid DNA using anionexchange chromatography. **J. Chromatogr. A**, v. 806, n. 1, p. 31-45, maio 1998.
- PUJALTE, I. et al. Cytotoxicity and oxidative stress induced by different metallic nanoparticles on human kidney cells. **Part. Fibre Toxicol.**, v.8, n. 10, mar 2011.

PUNZON, C.; ALCAIDE, A.; FRESNO, M. In vitro anti-inflammatory activity of *Phlebodium decumanum*. Modulation of tumor necrosis factor and soluble TNF receptors. **Int. Immunopharmacol.**, v. 3, n. 9, p.1293-1299, set 2003.

QI, P. et al. Toward large arrays of multiplex functionalized carbon nanotube sensors for highly sensitive and selective molecular detection. **Nano Letters**, v.3, n.3, p.347-351, fev 2003.

QUINA, F. H. Nanotecnologia e o meio ambiente: perspectivas e riscos. **Quim. Nova**, v. 27, n.6, p. 1028-1029, nov/dez 2004.

RAJENDRA, J. et al. Flow linear dichroism to probe binding of aromatic molecules and DNA to single-walled carbon nanotubes. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 126, n. 36, p. 11182-11188, set 2004.

RAMAKERS, C. et al. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neurosci. Lett.**, v. 339, n. 1, p. 62-66, mar 2003.

RAMKUMAR, K. M. et al. Oxidative stress-mediated cytotoxicity and apoptosis induction by TiO₂ nanofibers in HeLa cells. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 81, n. 2; p. 324-333, jun 2012.

RAVICHANDRAN, P. et al. Induction of apoptosis in rat lung epithelial cells by multiwalled carbon nanotubes. **J. Biochem. Mol. Toxicol.**, v. 23, n. 5, p. 333-344, set/out 2009.

RAVICHANDRAN, P. et al. Multiwalled carbon nanotubes activate NF- κ B and AP-1 signaling pathways to induce apoptosis in rat lung epithelial cells. **Apoptosis**, v. 15, p. 1507-1516, dez 2010.

RAVICHANDRAN, P. et al. Pulmonary biocompatibility assessment of inhaled single-wall and multiwall carbon nanotubes in BALB/c mice. **J. Biol. Chem.**, v. 286, n. 34, p. 29725-29733, ago 2011.

RAY, P. C.; YU, H.; FU, P. P. Toxicity and environmental risks of nanomaterials: challenges and future needs. **J. Environ. Sci. Health C Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.**, v. 27, n.1, p. 1-35, jan 2009.

RENZING, J.; LANE, D. P. p53-Dependent growth arrest following calcium phosphate-mediated transfection of murine fibroblasts. **Oncogene**, v. 10, n. 9, p. 1865-1868, maio 1995.

RIBAS, R. C. et al. Effect of zona pellucida removal on DNA methylation in early mouse embryos. **Biol. Reprod.**, v. 74, n. 2, p. 307-313, fev 2006.

RITTNER, K. et al. New basic membrane-destabilizing peptides for plasmid-based gene delivery in vitro and in vivo. **Mol. Ther.**, v. 5, n. 2, p. 104-114, fev 2002.

ROBL, J. M. et al. Transgenic animal production and animal biotechnology. **Theriogenology**, v. 67, n. 1, p. 127-133, jan 2007.

RODEA-PALOMARES, I. et al. Physicochemical characterization and ecotoxicological assessment of CeO₂ nanoparticles using two aquatic microorganisms. **Toxicol. Sci.**, v. 119, n. 1, p. 135-145, jan 2011.

RODEA-PALOMARES, I. et al. An insight into the mechanisms of nanoceria toxicity in aquatic photosynthetic organisms. **Aquatic Toxicol.**, v. 122-123, p. 133-143, out 2012.

ROGERS, N. J. et al. Physico-chemical behaviour and algal toxicity of nanoparticulate CeO₂ in freshwater. **Environ. Chem.**, v.7, n. 1, p. 50-60, fev 2010.

ROSTILA, A. et al. Peroxiredoxins and tropomyosins as plasma biomarkers for lung cancer and asbestos exposure. **Lung Cancer**, v. 77, n. 2, p. 450-459, ago 2012.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. **Methods Mol. Biol.**, v, 132, p. 365-386, 2000.

RYMAN-RASMUSSEN, J. P.; RIVIERE, J. E.; MONTEIRO-RIVIERE, N. A. Penetration of intact skin by quantum dots with diverse physicochemical properties. **Toxicol. Sci.**, v. 91, n.1, p. 159-165, maio 2006.

SABBIONI, E. et al. Interaction with culture medium components, cellular uptake and intracellular distribution of cobalt nanoparticles, microparticles and ions in Balb/3T3 mouse fibroblasts. **Nanotoxicology**, p. 1-12, dez 2012.

SABIKHI, L. Designer Milk. **Adv. Food Nutr. Res.**, v. 53, p. 161-198, 2007.

SAKAI, Y. et al. A novel transfection method for mammalian cells using gas plasma. **J. Biotechnol.**, v. 121, n. 3, p. 299-308, fev 2006.

SALAMONE, D. et al. High level expression of bioactive recombinant human growth hormone in the milk of a cloned transgenic cow. **J. Biotechnol.**, v. 124, n.2, p. 469-472, maio 2006.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATS, T. Molecular cloning a laboratory manual. New York, v. 3, 2001.

SANTOS JUNIOR, J. L.; CHAIN, C. P. Nanotecnologia e agricultura no Brasil: estado da arte e a arte do estado. Xiii encontro da associação nacional de pós-graduação e pesquisa em planejamento urbano e regional 25 a 29 de maio de 2009. Florianópolis - Santa Catarina - Brasil

SANVICENS, N.; MARCO, M. P. Multifunctional nanoparticles-properties and prospects for their use in human medicine. **Trends Biotechnol.**, v. 26, n. 8, p. 425-433, ago 2008.

SANZ, V. et al. Protamine and chloroquine enhance gene delivery and expression mediated by RNA-wrapped single walled carbon nanotubes. **J. Nanosci. Nanotechnol.**, v. 12, n.3, p.1739-1747, mar 2012.

- SARGENT, L. M. et al. Single-walled carbon nanotube-induced mitotic disruption. **Mutat. Res.**, v. 745, n. 1, p. 28-37, jun 2012.
- SAYES, C. M. et al. Functionalization density dependence of single-walled carbon nanotubes cytotoxicity in vitro. **Toxicol. Lett.**, v.161, n. 2, p. 135-142, fev 2006.
- SCHIRMER, J. M. et al. Recombinant adeno-associated virus vector for gene transfer to the transplanted rat heart. **Transpl. Int.**, v. 20, n. 6, p. 550-557, jun 2007.
- SCHRAND, A. M. et al. Differential biocompatibility of carbon nanotubes and nanodiamonds. **Diam. Relat. Mater.**, v.16, p. 2118-2123, ago 2007.
- SCHWAB, F. et al. Are carbon nanotube effects on green algae caused by shading and agglomeration? **Environ. Sci. Technol.**, v.45, n. 14, p. 6136-6144, jul 2011.
- SHARMA, M. Understanding the mechanism of toxicity of carbon nanoparticles in humans in the new millennium: a systemic review. **Indian J. Occup. Environ. Med.**, v. 14, n. 1, p. 3-5, jan 2010.
- SHARIFI, S. et al. Toxicity of nanomaterials. **Chem. Soc. Rev.**, v. 41, n. 6, p. 2323-2343, mar 2012.
- SHINDE, S. K. et al. Toxicity induced by nanoparticles. **Asian Pac. J. Trop. Dis.**, v. 2, n. 4, p. 331-334, 2012.
- SHI, X. et al. Cell entry of one-dimensional nanomaterials occurs by tip recognition and rotation. **Nat. Nanotechnol.**, v. 6, n. 11, set 2011.
- SHUKLA, R. K. et al. ROS-mediated genotoxicity induced by titanium dioxide nanoparticles in human epidermal cells. **Toxicol. In Vitro**, v. 25, n. 1, p. 231-241, fev 2011.
- SIMON-DECKERS, A. et al. Size-, composition- and shape-dependent toxicological impact of metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes toward bacteria. **Environ. Sci. Technol.**, v. 43, n.21, p. 8423-8429, nov 2009.
- SINGH, R. et al. Binding and condensation of plasmid DNA onto functionalized carbon nanotubes: toward the construction of nanotube-based gene delivery vectors. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 127, n.12, p. 4388-4396, mar 2005.
- SINNOTT, S. B. Chemical functionalization of carbon nanotubes. **J. Nanosci. Nanotechnol.**, v. 2, n. 2, p. 113-123, abr 2002.
- SMART, S. K. et al. The biocompatibility of carbon nanotubes. **Carbon**, v. 44, p. 1034-1047, nov 2006.
- SOHAEBUDDIN, S. K. et al. Nanomaterial cytotoxicity is composition, size, and cell type dependent. **Part. Fibre Toxicol.**, v. 7, p.22, ago 2010.

SOLMESKY, L. J. et al. Assessing cellular toxicities in fibroblasts upon exposure to lipid-based nanoparticles: a high content analysis approach. **Nanotechnology**, v. 22, n. 49, p. 494016, dez 2011.

SOM, C. et al. The importance of life cycle concepts for the development of safe nanoproducts. **Toxicology**. v. 269, p.160-169, mar 2010.

STURCOVA, A.; DAVIES, G. R.; EICHHORN, S. J. Elastic modulus and stress-transfer properties of tunicate cellulose whiskers. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 2, p. 1055-1061, mar 2005.

SUN, K. et al. Metal on metal oxide nanowire Co-catalyzed Si photocathode for solar water splitting. **Nanotechnology**, v. 23, n. 19, p. 194013, maio 2012.

SUZUKI, H.; TOYOOKA, T.; IBUKI, Y. Simple and easy method to evaluate uptake potential of nanoparticles in mammalian cells using a flow cytometric light scatter analysis. **Environ. Sci. Technol.**, v. 41, n. 8, p. 3018-3024, abr 2007.

TAKAGI, A. et al. Induction of mesothelioma in p53 ± mouse by intraperitoneal application of multi-wall carbon nanotube. **J. Toxicol. Sci.**, v. 33, n. 1, p. 105-116, fev 2008.

TAKHAR, P.; MAHANT, S. In vitro methods for nanotoxicity assessment: advantages and applications. **Arch. Appl. Sci. Res.**, v. 3, p. 389-403, 2011.

TEIXEIRA, E. M. et al. Cellulose nanofibers from white and naturally colored cotton fibers. **Cellulose**, v. 17, p. 595-606, fev 2010.

TERRADELAS, E. C. **Paper de la proteïna HERC1 en la via de senyalització de mTOR. Erk i p38 reguladors de la senyalització per aminoàcids.** 2009. 342f. Tese (Doutorado) - Universitat de Barcelona, 2009.

THIBODEAU, M. S. et al. Silica-induced apoptosis in mouse alveolar macrophages is initiated by lysosomal enzyme activity. **Toxicol. Sci.**, v. 80, n. 1, p. 34-48, jul 2004.

TOLEDO, J. R. et al. Polyethylenimine-based transfection method as a simple and effective way to produce recombinant lentiviral vectors. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 157, n. 3, p.538-544, jun 2009.

TOMONAGA, S. I.; SCHWINGER, J.; FEYNMAN, R. Awarded nobel prize for physics. **Science**, v. 150, n. 3696, p. 588-589, out 1965.

TONELLI, F.M. et al. Carbon nanotube interaction with extracellular matrix proteins producing scaffolds for tissue engineering. **Int. J. Nanomedicine**, v. 7, p. 4511-4529, ago 2012.

TRIGAL, B. et al. Cell Counts and Survival to Vitrification of Bovine In Vitro Produced Blastocysts Subjected to Sublethal High Hydrostatic Pressure. **Reprod. Dom. Anim.**, v. 48, n. 2, p. 200-206, abr 2013.

VALADARES, M. C. Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a “era do teste DL50”. **Ver. Eletron. Farm.**, v 3, n. 2, p. 93-98, nov 2006

VAMANU, C. I. et al. Induction of cell death by TiO₂ nanoparticles: studies on a human monoblastoid cell line. **Toxicol. In Vitro**, v. 22, n. 7, p. 1689-1696, out 2008.

VAN DELFT, M. F.; HUANG, D. C. How the Bcl-2 family of proteins interact to regulate apoptosis. **Cell Res.**, v. 16, n. 2, p. 203-213, fev 2006.

VARDHARAJULA, S. et al. Functionalized carbon nanotubes: biomedical applications. **Int. J. Nanomedicine**, v. 7, p. 5361-5374, out 2012.

VEELKEN, H. et al. Primary fibroblasts from human adults as target cells for ex vivo transfection and gene therapy. **Hum. Gene Ther.**, v. 5, p. 1203-1210, out 1994.

VERMA, A.; STELLACCI, F. Effect of surface properties on nanoparticle–cell interactions. **Small**, v. 6, n. 1, p. 12-21, jan 2010.

VITTORIO, O.; RAFFA V.; CUSHIER A. Influence of purity and surface oxidation on cytotoxicity of multiwalled carbon nanotubes with human neuroblastoma cells. **Nanomedicine**, v.5, n. 4, p. 424-431, dez 2009.

VON KLOT, S. et al. Increased asthma medication use in association with ambient fine and ultrafine particles. **Eur. Respir. J.**, v. 20, n. 3, p. 691-702, set 2002.

WALL, R.J. et al. Genetically enhanced cows resist intramammary *Staphylococcus aureus* infection. **Nat. Biotechnol.**, v. 23, n. 4, p. 445-451, abr 2005.

WALTERS, A. H. et al. Assessment of pronuclear formation following in vitro fertilization with bovine spermatozoa obtained after thermal insulation of the testis. **Theriogenology**, v. 65, n. 6, p. 1016-1028, abr 2006.

WAN, A. C.; YING, J. Y. Nanomaterials for in situ cell delivery and tissue regeneration. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 62, n. 7-8, jun 2010.

WANG, Z. Histone deacetylase 1 down-regulation on developmental capability and histone acetylation in bovine oocytes and parthenogenetic embryos. **Reprod. Domest. Anim.**, v. 46, n. 6, p. 1022-1028, dez 2011.

WANG, Q. Q. et al. Approaching zero cellulose loss in cellulose nanocrystal(CNC) production: recovery and characterization of cellulosic solid residues (CSR) and CNC. **Cellulose**, v.19, p. 2033-2047, ago 2012.

WATTIAUX, R. et al. Endosomes, lysosomes: their implication in gene transfer. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 41, n. 2, p. 201-208, mar 2000.

WEI, C. X. et al. Effects of silica nanoparticles on growth and photosynthetic pigment contents of *Scenedesmus obliquus*. **J. Environ. Sci.**, v. 22, n. 1, p. 155-160, jan 2010.

- WHEELER, M. B., WALTERS, E.M.;CLARK, S. G. Transgenic animals in biomedicine and agriculture: outlook for the future original research article. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 79, n.3-4, p. 265-289, dez 2003.
- WICHMANN, H. E. et al. Sources and elemental composition of ambient particles in Erfurt, Germany. In: Fortschritte in der Umweltmedizin (Wichmann HE, Schlipkötter HW, Fülgraff G, eds). Erfurt, Germany:Ecomed Publishers. 2002
- WICK, P. et al. The degree and kind of agglomeration affect carbon nanotube cytotoxicity. **Toxicol. Lett.**, v. 168, n.2, p. 121-131, jan 2007.
- WILHELM, C. Intracellular uptake of anionic superparamagnetic nanoparticles as a function of their surface coating. **Biomaterials**, v. 24, n. 6, p. 1001-1011, mar 2003.
- WILSON, M. R. et al. Interactions between ultrafine particles and transition metals *in vivo* and *in vitro*. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 184, n.3, p. 172-179, nov 2002.
- WOODROW WILSON INTERNATIONAL CENTER FOR SCHOLARS. Consumer products inventory. Washington, DC: Project on Emerging Nanotechnologies. 2012. Disponível em: <http://www.nanotechproject.org/inventories/consumer/>
- WORLE-KNIRSCH, M. J.; PULSKAMP, K.; KRUG, F. H. Oops they did it again! Carbon nanotubes hoax scientists in viability assay. **Nano Lett.**, v. 6, n. 6, p. 1261-1268, jun 2006.
- WU, Y. et al. Carbon nanotubes protect DNA strands during cellular delivery. **ACS Nano**, v. 2, n.10, p. 2023-2028, out 2008.
- WU, L. PEGylated Multi-Walled Carbon Nanotubes for Encapsulation and Sustained Release of Oxaliplatin. **Pharm. Res.**, v. 30, n. 2, p. 412-423, fev 2013.
- XIAO, C. et al. Association of HSP70 and genotoxic damage in lymphocytes of workers exposed to coke-oven emission. **Cell Stress Chaperones**, v. 7, p. 396-402, out 2002.
- XIN, L. et al. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. **Bioresour. Technol.**, v. 101, n. 14, p. 5494-5500, jul 2010.
- XU, P. F. et al. DNA mediated assembly of single walled carbon nanotubes: role of DNA linkers and annealing. **Phys. Chem. Phys.**, v. 13, n. 21, p. 10004-10008, jun 2011.
- XU, X. et al. Cellulose nanocrystals vs. cellulose nanofibrils: a comparative study on their microstructures and effects as polymer reinforcing agents. **ACS Appl. Mater. Interfaces**, v. 5, n. 8, p. 2999-3009, abr 2013.
- YAMANO, S.; DAI, J.; MOURSI, A. M. Comparison of transfection efficiency of nonviral gene transfer reagents. **Mol. Biotechnol.**, v. 46, n. 3, p. 287-300, nov 2010.
- YAMASHITA, K. et al. Carbon Nanotubes Elicit DNA Damage and Inflammatory Response Relative to Their Size and Shape. **Inflammation**, v. 33, n.4, p. 276-280, ago 2010.

YANG, H. et al. Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: the role of particle size, shape and composition. **J. Appl. Toxicol.**, v. 29, n. 1, p. 69-78, jan 2009.

YANG, W. et al. Carbon nanomaterials in biosensors: should you use nanotubes or graphene? **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.**, v. 49, n. 12, p. 2114-2138, mar 2010.

YANG, K. et al. Polyamidoamine dendrimer-functionalized carbon nanotubes-mediated GFP gene transfection for HeLa cells: Effects of different types of carbon nanotubes. **J. Biomed. Mater. Res. A**, v. 99, n. 2, p. 231-239, nov 2011.

YE, S. F. et al. ROS and NF- κ B are involved in upregulation of IL-8 in A549 cells exposed to multi-walled carbon nanotubes. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 379, n. 2, p. 643-648, fev 2009.

YEHIA, H. N. et al. Single-walled carbon nanotube interactions with HeLa cells. **J Nanobiotechnology**, v. 5, n.8, p. 1-17, out 2007.

YOO, K. C. et al. Titanium dioxide induces apoptotic cell death through reactive oxygen species-mediated Fas upregulation and Bax activation. **Int. J. Nanomedicine**, v. 7, p. 1203-1214, mar 2012.

YOON, K.; HSIAO, B. S.; CHU, B. Functional nanofibers for environmental applications. **J. Mater. Chem.**, v. 18, n. 39, p. 5326-5334, mar 2008.

ZALGEVIČIENĖ, L. et al. The effect of nanoparticles in rats during critical periods of pregnancy. **Medicina** (Kaunas). v. 48, n. 5, p. 256-264, 2012.

ZANGMEISTER, R. A. et al. Adsorption behavior of DNA-wrapped carbon nanotubes on self-assembled monolayer surfaces. **Langmuir**, v. 23, n. 11, p. 6252-6256, abr 2007.

ZHANG, J. et al. Expression of active recombinant human lactoferrin in the milk of transgenic goats. **Protein Expr. Purif.**, v. 57, n. 2, p. 127-135, fev 2008.

ZHANG, Y.; BAI, Y.; YAN, B. Functionalized carbon nanotubes for potential medicinal applications. **Drug Discov Today**, v. 15, n. 11-12, p. 428-435, jun 2010.

ZHANG, T. et al. Comparison of cytotoxic and inflammatory responses of pristine and functionalized multi-walled carbon nanotubes in RAW 264.7 mouse macrophages. **J. Hazard Mater.**, v. 219-220, p. 203-212, jun 2012.

ZHANG, G.; ZENG, X.; LI, P. Nanomaterials in cancer-therapy drug delivery system. **J Biomed. Nanotechnol.**, v. 9, n. 5, p. 741-750, maio 2013.

ZHAO, X.; LIU, R. Recent progress and perspectives on the toxicity of carbon nanotubes at organism, organ, cell, and biomacromolecule levels. **Environ. Int.**, v. 40, p. 244-256, jan 2012.

ZHENG, M. et al. DNA-assisted dispersion and separation of carbon nanotubes. **Nat. Mater.**, v. 2, n.5, p. 338-342, maio 2003.

ZHU, L. et al. DNA damage induced by multiwalled carbon nanotubes in mouse embryonic stem cells. **Nano Lett.**, v. 7, n. 12, p. 3592-3597, dez 2007.

ZHU, X. et al. Acute toxicities of six manufactured nanomaterial suspensions to *Daphnia magna*. **J. Nanopart. Res.**, v.11, p. 67-75, jun 2009.

ZUCKER, R. M. et al. Detection of TiO₂ nanoparticles in cells by flow cytometry. **Cytometry A**, v.77, n. 7, p. 677-685, jul 2010.

ZULUAGA, R. et al. Cellulose microfibrils from banana rachis: Effect of alkaline treatments on structural and morphological features. **Carbohydr. Polym.**, v. 6, n. 1, p. 51-59, mar 2009.

ZUPAN, G. et al. Effects of nimodipine, felodipine and amlodipine on electroconvulsive shock-induced amnesia in the rat. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 310, n. 2-3, p. 103-106, ago 1996.

APÊNDICES

Produção científica

APENDICE A- Artigo publicado na *Nanotechnology* – 2013

IOP PUBLISHING

NANOTECHNOLOGY

Nanotechnology 24 (2013) 075103 (8pp)

doi:10.1088/0957-4484/24/7/075103

Cytotoxicity and expression of genes involved in the cellular stress response and apoptosis in mammalian fibroblast exposed to cotton cellulose nanofibers**M M Pereira¹, N R B Raposo¹, R Brayner², E M Teixeira³, V Oliveira¹, C C R Quintão⁴, L S A Camargo⁴, L H C Mattoso³ and H M Brandão⁴**^{1,4} Nucleus of Analytical Identification and Quantification (NIQUA), Department of Pharmaceutical Sciences, Pharmacy Faculty, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, Brazil.² Interfaces, Traitements, Organisation et Dynamique des Systèmes (ITODYS), UMR CNRS 7086 University of Paris Diderot (Paris 7), Paris, France.³ Embrapa Instrumentação (CNPDIA), National Nanotechnology Laboratory for Agriculture (LNNA), São Carlos, Brazil.⁴ Embrapa Dairy Cattle (CNPGL), Juiz de Fora, Brazil.E-mail: mimunkbio@gmail.com and humberto.brandao@cnppl.embrapa.br

Received 12 November 2012, in final form 8 January 2013

Published 28 January 2013

Online at stacks.iop.org/Nano/24/075103**Short title:** Effect of the cotton cellulose nanofibers in *in vitro* cultured fibroblasts**Abstract**

Cellulose nanofibers (CNF) have mechanical properties that make them very attractive for applications in construction of polymeric matrices, drug delivery and tissue engineering. However, little is known about their impact on mammalian cells. The objective of this study was to evaluate the cytotoxicity of CNF and their effect on gene expression of fibroblasts cultured *in vitro*. The morphology of CNF was analyzed by transmission electron microscopy and the surface charge by Zeta potential. Cell viability was analyzed by flow cytometry assay and gene expression of biomarkers focused on cell stress response such as Heat shock protein 70.1 (HSP70.1) and Peroxiredoxin 1 (PRDX1) and apoptosis as B-cell leukemia (BCL-2) and BCL-2 associated X protein (BAX) by RT-PCR assay. Low concentrations of CNF (0.02 to 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$) did not cause cell death; however, at concentrations above 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$, the nanofibers significantly decreased cell viability ($86.41 \pm 5.37\%$). The exposure to high concentrations of CNF (2000 and 5000 $\mu\text{g ml}^{-1}$) resulted in increased HSP70.1, PRDX1 and BAX gene expression. The current study concludes that, under the conditions tested, high concentrations (2000 and 5000 $\mu\text{g ml}^{-1}$) of CNF cause decreased cell viability and affect the expression of stress- and apoptosis-associated molecular markers.

1. Introduction

Currently, there is a lot of use of various nanomaterials in the industrial, agricultural, pharmaceutical and medical fields [1-3]. The great advantage of nanostructured materials is the enhancement of their mechanical, optical, magnetic and chemical properties that differ from individual atoms and molecules, enabling the creation of improved materials, devices, and systems that exploit these new properties [4, 5].

Among existing nanomaterials, cellulose nanofibers (CNF) have emerged as an attractive nanomaterial due to their hydrophilicity, flexibility, mechanical strength and broad chemical-modifying capacity. Moreover, they are biodegradable [6, 5] and can be obtained from a range of renewable biosources, such as wood, straw, cotton, other plants, algae and microorganisms [7-10].

CNF are defined as long molecule sheaves stabilized by hydrogen bonds, with nano-sized diameters, (2 to 20 nm) and height varying from 10^{-6} to 10^{-3} cm depending on the cellulose source [11, 12]. These nanofibers can be applied in the production and reinforcing of polymer nanocomposites [13-15] barrier films and filtration

membranes [16, 17] drug delivery [18-20] and genetic engineering [21, 22]. In medicine, nanocellulose has applications as membranes that act as temporary wound dressings improving the healing process of burns and chronic wounds [23,24] as tubes that act as replacement blood vessels [25, 26] and other biomaterials like bone graft [27].

Despite their great potential applications, little is known about the effects of CNF on human and animal health and environment. CNF has similar morphology to carbon nanotubes (CNT) such as nanometer diameter and nano or micrometer length [9]. These later needles-like fibers have been compared to asbestos [28] causing lesions in mesothelial cells [29]. Thus, CNF may potentially have toxicity dependent on its morphology, which reinforces the need for studies on the toxicity of this nanomaterial. So far, few studies have evaluated the cytotoxicity of cellulose fibers (non-nanomaterial). For instance, a prior report [30] did not show toxic effects after chronic inhalation and intraperitoneal injection of cellulose fibers with a diameter greater than 100 nm in rats. Another study showed low cytotoxicity *in vitro* of cotton CNF in human lung cells [31]. However, in a recent study, the cotton CNF were reported genotoxic in plant cells, but were not cytotoxic to mouse fibroblasts [32]. Therefore, more studies in cotton CNF are needed on order to know the potential deleterious of this new nanomaterial. The aim of the present study was to evaluate *in vitro* the effect of cotton CNF on cell viability and gene expression of biomarkers related to cell stress response such as Heat shock protein 70.1 (HSP70.1), oxidative stress Peroxiredoxin 1 (PRDX1) and to apoptosis control such as B-cell leukemia (BCL-2) and BCL-2 associated X protein (BAX) using mammalian fibroblasts. To our knowledge, we provide the first evidence that high concentrations of cotton CNF may induce cell death and changes in gene expression of mammalian dermal fibroblast.

2. Materials and methods

2.1. Preparation of cotton cellulose nanofibers

All chemicals were purchased from Sigma Chemical (St Louis, MO, USA). Commercial cotton fibers were purchased from the local market. The fibers were finely chopped in a knife mill, passed through a 10-mesh sieve, dewaxed with 1:1 (v/v) ethanol:cyclohexane for 12 h in a Soxhlet apparatus and then vigorously washed with tap water. The dewaxed samples were dried for 12 h at 100 °C in an air-circulating oven. About 5 g of fibers were dispersed in 100 ml of 6.5 M sulfuric acid at 45 °C and stirred vigorously for 75 min. After that, 500 ml of cold distilled water was added to stop the reaction. The sulfuric acid was partially removed from the resulting suspension by centrifugation at 8,000 x g for 15 min. The non-reactive sulfate groups were removed by centrifugation followed by dialysis. Then the fibers were resuspended and dialyzed against tap water with a tubing cellulose membrane (76 mm, D9402- Sigma) until the pH reached 6–7. The resulting suspension was sonicated (Branson 450 sonifier, Branson Ultrasonics, Danbury, USA) for 5 min (in ice bath) and stored in a refrigerator.

2.2. Characterization of cotton cellulose nanofibers

For transmission electron micrograph (TEM) analysis, an aliquot of cotton CNF suspension was diluted and sonicated for 5 min. A drop of this resultant diluted suspension was deposited on a carbon micro grid net (400 meshes) and the grid was stained with a 1.5% solution of uranyl acetate and dried at room temperature. TEM images were obtained using a Philips CM200 transmission electron microscope with an acceleration voltage of 80 kV. The dimensions (length and diameter) were calculated with the ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland).

The Zeta potential of the cotton CNF was determined by dynamic light scattering (Zetasizer Nano ZS; Malvern Instruments Ltd, Malvern, Worcestershire, UK).

2.3. Cytotoxicity assay

The effect of cotton CNF on cell viability was assessed using flow cytometer assays. Bovine fibroblasts collected from Gyr cows were cultured in a Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplement with 10% fetal calf serum (FCS), 100 units ml⁻¹ penicillin–streptomycin and incubated at 37 °C, 5% CO₂ and 95% humidity and cryopreserved at second passage. Subsequently, fibroblasts were thawed and cultured at third passage prior to being utilized for this study. The cell culture and exposure conditions were evaluated according to ISO 10993-5 “Biological evaluation of medical devices-Test for cytotoxicity: *in vitro* methods” (or EN 30993-5), using direct contact. The cells were seeded into 6-well culture plates at a concentration of 1.5×10^4 and cultured for 48 h before exposure. A stock solution of cotton CNF (5 mg ml⁻¹) was prepared by suspending the nanomaterials in a DMEM medium and it was sonicated three times for 2 min to disperse the agglomerates. Cells reaching 60% confluence were performed by inverted light microscope (ICM 405, Zeiss, Oberkochen, DE) and exposed to cotton CNF at different concentrations: 0 (vehicle control), 0.02, 0.20, 0.50, 1.00, 1.50, 100, 200, 400, 800, 1000, 2000, 3000 and 5000 µg ml⁻¹ for 24 h. Cell viability was evaluated by flow cytometry assay and

then cells were stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ for further relative quantification of transcript levels. Representative micrographs of vehicle control and treated cells are shown in figure 1.

2.4. Flow cytometric cytotoxicity assay

The fibroblasts were treated with 0.25% (w/v) trypsin-0.53 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) for 3 min to allow the cells to detach from the bottom. Trypsin was deactivated with a DMEM medium supplemented with 10% FCS. The cells were collected by centrifugation at $10,000\times g$ and washed twice with 1 ml of the ice-cold Phosphate-buffered saline solution (pH 7.2). Propidium iodide (PI) was added to the cell suspension at a final concentration of $50\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$ and cells were then incubated at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ in a water bath for 30 min. The fractions of the living and dead cells were analyzed by flow cytometry (FACScalibur; Becton Dickinson, San Jose, CA).

A flow cytometer equipped with a $585\pm 42\text{ nm}$ laser was used to detect cells positive for the PI dye (FL2 channel). Three repetitions with three replicates each were carried out, counting 10,000 cells per replicate. The data were analyzed using the WindMDI 2.8 software (Joe Trotter, Scripps Research Institute).

2.5. Gene Expression Analysis

Total RNA was extracted from three pools of 2×10^5 cells per group using the RNeasy Micro Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions and treated with DNase. The RNA samples were reverse transcribed using the SuperScript III First-Strand Synthesis Supermix (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Quantification of RNA and cDNA from each pool by group was performed using $1\text{ }\mu\text{l}$ sample in a spectrophotometer (Nanodrop, Wilmington, DE, USA).

Relative quantification was performed in triplicate using real-time PCR (Applied Biosystems ABI Prism 7300 Sequence Detection Systems, Foster City, CA, USA). Reactions were prepared using a mixture of SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), primers, nuclease-free water and cDNA. The amount of cDNA used in the reactions varied according to the optimal concentration identified in preliminary experiments for each transcript analyzed. For HSP70.1, PRDX1, BAX and BCL-2 genes, 800 ng cDNA per reaction was used, whereas for Histone H2a gene, 400 ng cDNA per reaction was used. The cDNA template was denatured at $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 10 min, followed by 45 cycles of $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 15 s, the gene-specific primer annealing temperature for 30 s (table 1) and elongated at $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 30 s. After each PCR run, a melting curve analysis was performed to confirm that a single specific product was generated. Negative vehicle controls, including the PCR reaction mixture without nucleic acids, were also run with each group of samples. Expression of the Histone H2a gene was used as housekeeping gene and the vehicle control group ($0\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$ cotton CNF) was used as a calibrator. Primer efficiency for each reaction was calculated using LinRegPCR software [33].

2.6. Statistical analysis

Data were analyzed by ANOVA and differences among means were compared by the Student–Newman–Keuls' (SNK) test using the general linear model (GLM) by SAS version 9.1 (SAS Institute, Cary, NC, USA). Relative gene expression analyses were performed by REST software [34] using a pair-wise fixed reallocation randomization test and were based on primer efficiency. $P < 0.05$ was considered significant.

3. Results

3.1. Characterizations of cotton CNF

The morphological study of the cotton CNF suspensions by TEM is shown in figure 2. The images revealed that cotton CNF, used in this study, are elongate needle-like nanomaterials with a diameter of about 6–18 nm and a length of 85–225 μm .

3.2. Flow cytometric cytotoxicity assay

The percentage of live cells was not affected ($P=0.0613$) after exposure to cotton CNF at the concentrations of 0.02 ($92.37\pm 1.31\%$), 0.20 ($94.00\pm 1.29\%$), 0.50 ($92.33\pm 1.35\%$), 1.00 ($92.25\pm 1.37\%$), 1.50 ($89.93\pm 1.17\%$) and $100\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$ ($90.78\pm 3.20\%$) compared to vehicle control group ($94.27\pm 1.52\%$) (figures 3 and 4). Cell viability was significantly reduced ($P=0.0001$) with cotton CNF concentrations of 200 ($86.41\pm 5.37\%$), 400 ($86.32\pm 1.31\%$), 800 ($76.79\pm 2.74\%$), 1000 ($71.94\pm 2.76\%$) 2000 ($67.99\pm 4.63\%$), 3000 ($55.97\pm 2.37\%$) and $5000\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$ ($36.51\pm 2.58\%$) (figures 3 and 4).

3.3. Gene Expression Analysis

To further investigate the decrease of cell viability induced by cotton CNF at greater concentrations (2000 and $5000\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$) than the nontoxic group ($100\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$), we examined the expression of genes associated

with response to toxicity (HSP70.1), oxidative stress (PRDX1) and apoptosis control (BAX and BCL-2) by real-time PCR assay. In fibroblasts exposed to 2000 $\mu\text{g ml}^{-1}$ cotton CNF, the relative expressions of HSP70.1 (1.57 ± 0.43 ; $P=0,001$), PRDX1 (1.41 ± 0.39 ; $P=0,001$) and BAX (1.41 ± 0.36 ; $P=0,006$) were up-regulated when compared to the vehicle control group (Fig. 5). Similarly, at 5000 $\mu\text{g ml}^{-1}$ cotton CNF, the fibroblasts showed relatively higher levels of the HSP70.1 (1.74 ± 0.26 ; $P=0,001$), PRDX1 (1.38 ± 0.29 ; $P=0,026$) and BAX (1.33 ± 0.17 ; $P=0,003$) transcripts when compared to the vehicle control group (figure 5). In contrast, in fibroblasts exposed at 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of cotton CNF, out of five genes evaluated, three of them (HSP70.1 - 1.00 ± 0.13 , $P=0,903$; PRDX1 - 1.16 ± 0.18 , $P=0,099$; and BCL-2 - 1.22 ± 0.26 , $P=0,084$) were similar to the vehicle control group (figure 5). Additionally, the ratios of BAX ($P=0,001$) and BCL-2 ($P=0,001$) mRNA expression in 2000 and 5000 $\mu\text{g ml}^{-1}$ cotton CNF groups were higher than in 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ cotton CNF group (table 2).

4. Discussion

In the present study, it was found that concentrations of cotton CNF higher than 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$ are toxic to cells cultured *in vitro*. However, no difference was noticed between the 200 and 400 $\mu\text{g ml}^{-1}$ cotton CNF concentrations tested, demonstrating a similar effect between them. The nanoparticles may cause cytotoxicity because of their small size, chemical or physical properties [35] and high reactivity [36]. Previous studies have suggested that the toxicity of different nanoparticles may primarily be due to particle shapes [37, 38]. Furthermore, higher concentrations of nanomaterials produced higher percentages of dead cells as compared to the lower concentrations of nanomaterials [39]. With microsized cellulose fibers displaying diameter higher than 100 nm, no cytotoxicity occurred after chronic inhalation and intraperitoneal injection of these materials in rats [30]. With nanosized materials, bacterial CNF (1 mg ml^{-1}), cotton CNF (0.005 mg ml^{-1} and 1 mg ml^{-1}) exposure do not induce toxic effects in mouse embryo fibroblasts [7], in human lung cells [31], or mouse fibroblasts [32], respectively. However, other nanomaterial with similar shape such as CNT, can cause toxicity depending on the structure (i.e. needle-like), as described previously [40] in mouse macrophages exposed to CNT. In our study, the cotton CNF, which have a similar needle-like shape, were added to fibroblast cultured *in vitro* at high concentrations, together these conditions can cause damage to the cell membrane and interfere with compartmentalization in the cell, increasing cell death.

Previous studies have shown that cotton CNF did not cause any form of frustrated phagocytosis in macrophage cells, and they were completely internalized within a vesicle, suggesting that they enter these phagocytic cells through a form of endocytosis [31] that most often culminates with lysosome internalization [41]. This observation can be attributed to their relatively short length (diameter of about 15nm and a length of 220 μm) similar to that used in our study (diameter of about 6-18 nm and a length of 85-225 μm), and then it is possible that the toxicity observed at higher concentrations may be due to DNA damage, injury of membrane or endosomal compartments [32, 42]. Possibly, the increased cotton CNF exposure resulted in proportional increases in particle uptake. As a result, this may lead a saturation of the lysosomes and generation of reactive oxygen species (ROS). In response to oxidants, cells up-regulate the expression of PRDX1 [43, 44]. However, additional studies are needed to determine the mechanisms of action by which cotton CNF induce cytotoxicity.

The expression of the HSP70 gene is an important biomarker of cellular damage. HSP70 proteins play an essential role as molecular chaperones by refolding of stress misfolded proteins and thus protecting the cell homeostasis [45]. Under physiological conditions, these proteins are expressed at low levels, but stressful stimuli such as extreme temperature, heavy metals and other environmental stresses can induce a substantial increase in intracellular levels of HSPs [46]. In this study, the *in vitro* culture conditions were similar for all groups, varying only the concentration of cotton CNF, suggesting that high concentrations of cotton CNF may interfere with cellular homeostasis. Therefore, it is likely that under certain conditions, nanomaterials can stimulate the expression of HSP70, confirming a previous report on CNT [45] and chitosan nanoparticles [47]. On the other hand, aggregation or agglomeration of nanoparticles is an important factor in understanding potential cytotoxicity [48]. In the present study, one can observe that higher concentrations of cotton CNF resulted in large CNF aggregates (figure 1D) and altered gene expression of Hsp70.1, which could have induced the cytotoxicity. Previous studies reported that large titanium dioxide nanoparticle aggregates could cause an increment in gene expression of Hsp and a decrease in cell viability [49]. Agglomerated CNT showed a more adverse effect than well-dispersed CNT [50]. Nevertheless, Lima *et al* [32] showed that the aggregation of CNF appeared to reduce toxicity. Although aggregates were not observed macroscopically in the stock solution or culture medium, they were observed with the aid of a microscope. Thus, cotton CNF shows a strong tendency to agglomerate in highly concentrated aqueous solutions. These observations suggest that the aggregates may be toxic for cells. This is due to strong inter- and intra-molecular hydrogen bonding, thereby, the nanofibers are highly hydrophilic and in nonpolar media tend to form aggregates [32].

PRDX1 is member of the PRDX family of antioxidant proteins involved in redox regulation of the cell. In the present study, PRDX1 mRNAs were up-regulated in groups with a substantial decrease in cell viability

(2000 and 5000 $\mu\text{g ml}^{-1}$ cotton CNF). Elevated amounts of intracellular ROS produced as a result of an exogenous stressor can damage DNA, protein and lipids through oxidation [51]. Moreover, nanomaterials are known to stimulate the cells ability to produce toxic ROS due to their large surface area [52]. The high biological activity of cotton CNF caused by their large specific surface area can create a high potential pro-oxidant in fibroblasts used in this study. We speculate that the up-regulation of PRDX1 mRNAs could represent an attempt by the cells to minimize oxidative stress under the higher cotton CNF exposure. Interestingly, in human patients exposed to other fibers, like asbestos, high plasma levels of the PRDX1 proteins were identified [53]. These same authors suggested that PRDX1 could be a biomarker for asbestos exposure. One of the main mechanisms of toxicity of the nanomaterials is the inducement of cellular oxidative stress leading to apoptosis [54]. Therefore, cotton CNF can promote cell death due to increased cellular oxidative stress.

Exposure of fibroblasts to cotton CNF (both at 2000 and 5000 $\mu\text{g ml}^{-1}$) resulted in up-regulation of the BAX gene (figure 5). In contrast, the relative amounts of BCL-2 transcripts in cells in all groups do not display altered expression and in fibroblasts exposed at 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ cotton CNF, only the gene BAX (0.76 ± 0.09) was down-regulated (figure 5). BAX (pro-apoptotic) and BCL-2 (anti-apoptotic) are members of the BCL-2 family of proteins that protect cells from apoptosis and their protein ratio determines the life or death of cells in response to an apoptotic stimulus [55]. The actions of BAX appear to be neutralized when heterodimerized with BCL-2 and the proportion of BAX to BCL-2 proteins predetermined the cellular response to an apoptotic stimulus [56]. Thus, a high BAX/BCL-2 ratio drives the cells to apoptosis. In the current study, the BAX/BCL-2 ratio transcripts in fibroblasts (exposed to 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ cotton CNF) with values less than 1 (table 2) retained their viability (figures 3 and 4), while an increase of the ratio above 1, such as in the 2000 and 5000 $\mu\text{g ml}^{-1}$ groups, was consistent with the increase in cell death measured by flow cytometry assay (table 2; figures 3 and 4).

From figure 5, we knew that BAX was significantly down-regulated and this occurred without a compensatory rise in BCL-2. Additionally, no significant cell death was observed in fibroblasts treated with 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (figure 4). It can be hypothesized that cotton CNF mediates BAX down-regulation in low concentrations. Interestingly, previous studies showed that chitosan, other nanoparticle, promotes BAX down-regulation, thereby preventing apoptosis [57]. Further studies are necessary to examine the mechanisms of BAX down-regulation in cells exposed to cotton CNF and its implication on cellular apoptosis.

Results from this study suggest that the up-regulation of BAX transcripts in both the 2000 and 5000 $\mu\text{g ml}^{-1}$ cotton CNF groups caused a shift in the BAX/BCL-2 balance and greater susceptibility of the fibroblasts to apoptosis resulting in a high percentage of cell death. The BAX/BCL-2 ratio showed a correlation with sensitivity to cell death in fibroblasts after their exposure to cotton CNF at high concentrations. On the other hand, the results suggest that 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ cotton CNF did not alter cell viability because the amount of BCL-2 was greater than that of BAX transcripts (figure 5) and the BAX/BCL-2 ratio was less than 1 (table 2), therefore, the anti-apoptotic BCL-2 transcripts was able to prevent the triggering of apoptosis, retaining cell homeostasis and maintaining its viability, as observed by flow cytometry assay. For other nanomaterials, an increased level of BAX proteins in CNT treated rat lung cells [58], human liver cells exposed to titanium dioxide (TiO_2) [59] and BAX transcripts in lung cells treated with silver nanoparticles were shown [60]. Therefore, the up-regulation of BAX and BAX-BCL-2 ratio are good markers for monitoring biological effects of nanomaterials, especially cotton CNF, on mammalian cells.

5. Conclusions

This work presents the first evidence that exposure to high concentrations of cotton CNF may induce cell death and changes in gene expression of mammalian fibroblasts cultured *in vitro*. Under the conditions tested, this study determined the concentrations of the cotton CNF that reduced the cell viability percentage by more than 50% compared to vehicle control group by flow cytometry assay. *In vitro* exposure from 0 to 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of cotton CNF was not cytotoxic, but from this concentration a decrease in the cell viability up to 36.51% at 5000 $\mu\text{g ml}^{-1}$ cotton CNF group has been observed.

Real-time PCR assay results showed that at high concentrations (2000 and 5000 $\mu\text{g ml}^{-1}$) of cotton CNF, the expression of stress- and apoptosis-transcripts were up-regulated in fibroblasts, confirming the findings of the viable cell counts by flow cytometry assay. This data suggest that HSP70.1, PRDX1, BAX and BCL-2 genes are good biomarkers of cytotoxicity responses in cells exposure to cotton CNF.

Acknowledgments

This work was supported by the Rede de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio (AGRONANO), Rede Mineira de Pesquisas em Nanotecnologia (NANOBIOMG), FAPEMIG, CNPq, and CAPES (04/CII-2008-Projet 7 Network Brazil Nanobiotec).

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- [1] Ghormade V, Deshpande MV, Paknikar KM 2011 *Biotechnol. Adv.* 29 792-803.
- [2] Stebounova LV, Morgan H, Grassian VH, Brenner S. 2011 *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 4 310-321.
- [3] Santos CM, Mangadlao J, Ahmed F, Leon A, Advincula RC, Rodrigues DF 2012 *Nanotechnology.* 23 395101.
- [4] Moore MN 2006 *Environ. Int.* 32 967-976.
- [5] Kolakovic R, Peltonen L, Laaksonen T, Putkisto K, Laukkanen A, Hirvonen J 2011 *AAPS PharmSciTech.* 12 1366-1373.
- [6] Klemm D, Schumann D, Udhart U, Marsch S 2001 *Prog. Polym. Sci.* 26 1561-1603.
- [7] Moreira S, Silva NB, Almeida-Lima J, Rocha HAO, Medeiros SRB, Alves C, Gama FM 2009 *Toxicol. Lett.* 189 235-241.
- [8] Zuluaga R, Putaux JL, Cruz J, Vélez J, Mondragon I, Gañán P 2009 *Carbohydr. Polym.* 6 51-59.
- [9] Eichhorn SJ, Dufresne A, Aranguren M, Marcovich NE, Capadona JR, Rowan SJ, Weder C, Thielemans W, Roman M, Renneckar S, Gindl W, Veigel S, Keckes J, Yano H, Abe K, Nogi M, Nakagaito AN, Mangalam A, Simonsen J, Benight AS, Bismarck A, Berglund LA, Peijs TJ 2010 *J. Mater. Sci.* 45 1-33.
- [10] Teixeira EM, Corrêa AC, Manzoli A, Leite FL, Oliveira CR, Mattoso LHC 2010 *Cellulose.* 17 595-606.
- [11] Azizi Samir MAS, Alloin F, Dufresne A 2005 *Biomacromolecule.* 6 612-626.
- [12] Zhou C, Wu Q, Yue Y, Zhang Q 2011 *J. Colloid. Interface Sci.* 353 116-123.
- [13] Azeredo HMC, Mattoso LHC, Avena-Bustillos RJ, Filho GC, Munford ML, Wood D, McHugh TH 2010 *J. Food Sci.* 75 1-7.
- [14] Peng XW, Ren JL, Zhong LX, Sun RC 2011 *Biomacromolecules.* 12 3321-3332.
- [15] Ago M, Okajima K, Jakes JE, Park S, Rojas OJ 2012 *Biomacromolecules.* 13 918-926.
- [16] Dogan N, McHugh TH 2007 *J. Food Sci.* 72 16-22.
- [17] De Moura MR, Aouada FA, Avena-Bustillos RJ, McHugh TH, Krochta JM, Mattoso LHC 2009 *J. Food Engr.* 92 448-453.
- [18] Jackson JK, Letchford K, Wasserman BZ, Ye L, Hamad WY, Burt, HM 2011 *Int. J. Nanomedicine* 6 321-330.
- [19] Villanova JC, Ayres E, Carvalho SM, Patrício PS, Pereira FV, Oréface RL 2011 *Eur. J. Pharm. Sci.* 42 406-415.
- [20] Kolakovic R, Laaksonen T, Peltonen L, Laukkanen A, Hirvonen J 2012 *Int. J. Pharm.* 430 47-55.
- [21] Tabuchi M, Kobayashi K, Fujimoto M, Baba Y 2005 *Lab. Chip.* 5 1412-1415.
- [22] Laaksonen P, Walther A, Malho JM, Kainlahti M, Ikkala O, Linder MB 2011 *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 50 8688-8691.
- [23] Fontana JD, Franco VC, de Sousa SJ, Lyra IN, de Souza AM 1991 *Appl. Biochem. Biotechnol.* 29 341-351.
- [24] Czaja WK, Young DJ, Kawecki M, Brown RM 2007 *Biomacromolecules.* 8 1-12.
- [25] Klemm D, Schumann D, Kramer F, Hessler N, Hornung M, Schmauder HP, Marsch S 2006 *Adv. Polymer. Sci.* 205 49-96.
- [26] Wan WK, Hutter JL, Millon L, Guhadós G 2006 *ACS Symp. Ser.* 938 221-241.
- [27] Hutchens AS, Bendon RS, Evans BR, O'Neill HM, Rawn CJ 2006 *Biomaterials.* 27 4661-4670.
- [28] Kim JS, Song KS, Lee JK, Choi YC, Bang IS, Kang CS, Yu IJ 2012 *Arch. Toxicol.* 86 553-62.
- [29] Poland CA, Duffin R, Kinloch I, Maynard A, Wallace WA, Seaton A, Stone V, Brown S, Macnee W, Donaldson K 2008 *Nat. Nanotechnol.* 3 423-428.
- [30] Cullen RT, Searl A, Buchanan D, Davis JM, Miller BG, Jones AD 2000 *Inhal. Toxicol.* 12 959-977.
- [31] Clift MJ, Foster EJ, Vanhecke D, Studer D, Wick P, Gehr P, Rothen-Rutishauser B, Weder C 2011 *Biomacromolecules* 12 3666-3673.
- [32] Lima R, Feitosa LO, Maruyama CR, Barga MA, Yamawaki PC, Vieira IJ, Teixeira EM, Corrêa AC, Mattoso LHC, Fraceto LF 2012 *Int. J. Nanomedicine.* 7 3555-3565.
- [33] Ramakers C, Ruijter JM, Deprez RH, Moorman AF 2003 *Neurosci. Lett.* 339 62-66.
- [34] Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle, L 2002 *Nucleic Acids Res.* 30 36.
- [35] Sayes CM, Liang F, Hudson JL, Mendez J, Guo W, Beach JM, Moore VC, Doyle CD, West JL, Billups WE, Ausmanb KD, Colvin VL 2006 *Toxicol. Lett.* 161 135-142.
- [36] Deng X, Luan Q, Chen W, Wang Y, Wu M, Zhang H, Jiao Z 2009 *Nanotechnology.* 20 115101.
- [37] Sohaebuddin SK, Thevenot PT, Baker D, Eaton JW, Tang L 2010 *Part. Fibre Toxicol.* 7 22.
- [38] Zhao X, Ng S, Heng BC, Guo J, Ma L, Tan TT, Ng KW, Loo SC 2012 *Arch. Toxicol.*
- [39] Mahmood M, Casciano DA, Mocan T, Iancu C, Xu Y, Mocan L, Iancu DT, Dervishi E, Li Z, Abdalmuhsen M, Biris AR, Ali N, Howard P, Biris AS 2010 *J. Appl. Toxicol.* 30 74-83.
- [40] Zhang T, Tang M, Kong L, Li H, Zhang T, Zhang S, Xue Y, Pu Y 2012 *J. Hazard. Mater.* 15 203-212.
- [41] Stern ST, Adiseshiaiah PP, Crist RM 2012 *Part. Fibre Toxicol.* 9:20.
- [42] Nel AE, Mädler L, Velegol D, Xia T, Hoek EM, Somasundaran P, Klaessig F, Castranova V, Thompson M 2009 *Nat. Mater.* 8(7):543-57.
- [43] Ishii T, Itoh K, Akasaka J, Yanagawa T, Takahashi S, Yoshida H, Bannai S, Yamamoto M 2000 *Carcinogenesis* 21 1013-1016.
- [44] Li B, Ishii T, Tan CP, Soh JW, Goff SP 2002 *J. Biol. Chem.* 277 (14): 12418-12422
- [45] Cicchetti R, Divizia M, Valentini F, Argentin G 2011 *Toxicol. In Vitro.* 25 1811-1819.
- [46] Xiao C, Chen S, Li J, Hai T, Lu Q, Sun E, Wang R, Tanguay RM, Wu T 2002 *Cell Stress Chaperon.* 7 396-402.
- [47] Hu YL, Qi W, Han F, Shao JZ, Gao JQ 2011 *Int. J. Nanomedicine.* 6 3351-3359.
- [48] Baveyer P; Laba M 2008 *Environ. Health Perspect.* 116: A152.
- [49] Okuda-Shimazaki J, Takaku S, Kanehira K, Sonezaki S, Taniguchi A 2010 *Int. J. Mol. Sci.* 11(6):2383-2392.
- [50] Wick P, Manser P, Limbach LK, Dettlaff-Weglikowska U, Krumeich F, Roth S, Stark WJ, Bruinink A 2007 *Toxicol. Lett.* 168(2):121-131.
- [51] Rani V, Neumann CA, Shao C, Tischfield JA 2012 *Mutat. Res.* 735 39-45.
- [52] Pujalte I, Passagne I, Brouillaud B, Treguer M, Durand E, Courtes CO, Lazou B 2011 *Part. Fibre Toxicol.* 8 10.
- [53] Rostila A, Puustinen A, Toljamo T, Vuopala K, Lindström I, Nymän TA, Oksa P, Vehmas T, Anttila SL 2012 *Lung Cancer.* 77 450-459.
- [54] Ramkumar KM, Manjula C, Gnanakumar G, Kanjwal MA, Sekar TV, Paulmurugan R, Rajaguru P 2012 *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 81 324-333.
- [55] van Delft MF, Huang DC 2006 *Cell Res.* 16 203-213.
- [56] Basu A, Haldar, S 1998 *Mol. Hum. Reprod.* 4 1099-1109.
- [57] Han L, Du LB, Kumar A, Jia HY, Liang XJ, Tian Q, Nie GJ, Liu Y 2012 *Biomaterials.* 33 (33):8517-8528.
- [58] Ravichandran P, Baluchamy S, Sadanandan B, Gopikrishnan R, Biradar S, Ramesh V, Hall JC, Ramesh GT 2010 *Apoptosis.* 15 1507-1516.
- [59] Yoo KC, Yoon CH, Kwon D, Hyun KH, Woo SJ, Kim RK, Lim EJ, Suh Y, Kim MJ, Yoon TH, Lee SJ 2012 *Int. J. Nanomedicine.* 7 1203-1214.

[60] Lee YS, Kim DW, Lee YH, Oh JH, Yoon S, Choi MS, Lee SK, Kim JW, Lee K, Song CW 2011 *Arch. Toxicol.* 85 1529-1540.

Figure Captions

Figure 1. Photomicrographs of bovine fibroblasts cells incubated for 24 h with different amount of cotton CNF. **A**, cells were cultured with appropriate growth medium only (vehicle control group); **B**, cells were cultured with $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ cotton CNF; **C**, cells were cultured with $2000 \mu\text{g ml}^{-1}$ cotton CNF. **D**, cells were cultured with $5000 \mu\text{g ml}^{-1}$ cotton CNF. The magnification was $40\times$.

Figure 2. (A) Suspensions of cotton cellulose nanofibers (CNF) in DMEM cell medium (5 mg ml^{-1}). (B) and (C) TEM micrographs of cotton CNF. The images revealed that cotton CNF are elongate needle-like nanoparticles with diameter of about 6-18 nm and length of 85-225 μm . The magnifications were $66\times$ (B) and $110\times$ (C).

Figure 3. Flow cytometry analysis of bovine fibroblasts treated with different concentrations of cotton cellulose nanofibers for 24 h and then stained with propidium iodide. Significant increases in cell death were observed in bovine fibroblasts exposed to concentrations higher than $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ of cotton CNF. The upper quadrant in each panel shows the dead cell population and the lower quadrant shows the live cell population. **FSC**, Forward Scatter Signal (cell size). **FL2**, fluorescence parameter for propidium iodide

Figure 4. Effect of cotton cellulose nanofibers on cytotoxicity of bovine fibroblasts after 24 h, at 0.00 (vehicle control group), 0.02 to $5000 \mu\text{g ml}^{-1}$ of cotton CNF for 24 h. Flow cytometry protocol for analysis of cell viability using propidium iodide. Mean \pm SEM over values of three independent experiments. *Asterisks denote a significant difference from the vehicle control group ($P < 0.05$); ns: indicates not significant between two groups at the indicated time ($P > 0.05$)

Figure 5. Relative abundance of HSP70.1, PRDX1, BAX and BCL-2 genes in bovine fibroblasts exposed to cotton cellulose nanofibers for 24 h. Transcript levels in cells of vehicle control group ($0 \mu\text{g ml}^{-1}$ cotton CNF) were used as the calibrator (relative expression = 1.00). Data is expressed as percent of vehicle control group mean \pm SEM of three independent experiments. * Asterisks denote a significant difference from the vehicle control group ($P < 0.05$)

Table 1. Primer sequences used for relative gene expression analysis by real-time polymerase chain reaction.

Gene name	Primer sequences (5'-3')	Fragment size (bp)	GenBank accession no.
HSP70.1	F: AACAAAGATCACCATCACCAACG R: TCCTTCTCCGCAAGGTGTG	275	NM174550
PRDX1	F: ATGCCAGATGGTCAGTTCAAG R: CCTTGTTTCTTGGGTGTGTTG	224	AF305561
BAX	F: TTTGCTTCAGGGTTTCATCCAGGA R: CAGCTGCGATCATCCTCTGCAG	174	NM173894
BCL-2	F: TGGATGACCGAGTACCTGAA R: CAGCCAGGAGAAATCAAACA	120	XM_586976
H2a	F: GCCATCCTGGAGTACCTCAC R: TGGATGTGTGGAATGACACC	176	NM_174809

Table 2. The ratio of expression of BAX/BCL-2 mRNA expressions in fibroblasts exposed to cotton cellulose nanofibers.

Groups	BAX*	BCL-2*	BAX/BCL-2 ratio**
vehicle control group	1	1	1
100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ cotton CNF	0.76 \pm 0.09	1.23 \pm 0.26	0.62
2000 $\mu\text{g ml}^{-1}$ cotton CNF	1.41 \pm 0.36	0.94 \pm 0.25	1.50
5000 $\mu\text{g ml}^{-1}$ cotton CNF	1.33 \pm 0.17	1.11 \pm 0.20	1.20

*Values of BAX and BCL-2 expression in fibroblast exposed to cotton cellulose nanofibers were quantified by real-time PCR assay shown in figure 4 using the REST software. **BAX/BCL-2 ratio < 1 characterizes fibroblasts resistant to cotton cellulose nanofibers-induced cell death and a BAX/BCL-2 ratio > 1 fibroblasts sensitive to cotton cellulose nanofibers-induced cell death. Data were expressed as relative expression ratio (mean \pm SEM).

Ecotoxicological effects of carbon nanotubes and cotton cellulose nanofibers in the green microalga *Chlorella vulgaris*

Michele Munk Pereira^{1,2}, Ludovic Mouton³, Claude Yéprémian⁴, Alain Couté⁴, Joanne Lo⁵, José Manoel Marconcini⁶, Luiz Orlando Ladeira⁷, Nádia Rezende Barbosa Raposo¹, Humberto de Mello Brandão⁸ and Roberta Brayner³

¹ Nucleus of Analytical Identification and Quantification (NIQUA), Federal University of Juiz de Fora, 36036-900, Juiz de Fora, Brazil

² Department of Biology, Center for Higher Education of Juiz de Fora (CESJF), 36030-776, Juiz de Fora, Brazil

³ Interfaces, Traitements, Organisation et Dynamique des Systèmes (ITODYS), University of Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, 75086, Paris, France

⁴ Muséum National d'Histoire Naturelle, Département Régulations, Développement et Diversité Moléculaire (RDDM), 75005, Paris, France

⁵ Institut Jacques Monod, CNRS, University Paris Diderot, 75205, Paris, France

⁶ Embrapa Instrumentation (CNP/DIA), National Nanotechnology Laboratory for Agriculture (LNNA), 13560-970, São Carlos, Brazil

⁷ Department of Physics, Federal University of Minas Gerais, 31270-901, Belo Horizonte, Brazil

⁸ Embrapa Dairy Cattle (CNPGL), 36038-330, Juiz de Fora, Brazil

Correspondence may addressed to: Michele Munk Pereira, Nucleus of Analytical Identification and Quantification, Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Juiz de Fora, José Lourenço Kelmer, São Pedro, 36036-900, Juiz de Fora, Brazil, Fax: +35 3221023809. E-mail: mimunkbio@gmail.com

Abbreviations: BB, Bold's basal medium; Fv/Fm, variable over maximal fluorescence; PS II, photosystem II; EPS, extracellular polymeric substance.

Abstract

Multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) and cotton cellulose nanofibers (CNFs) are interesting nanoparticles (NPs) which possess great potential for applications in various fields such as in water treatment, reinforcement materials and medical devices. However, the rapid dissemination of NPs can cause impact on the environment and in the human health. Thus, the aim of this study was to evaluate the MWCNT and cotton CNF toxicological effects toward freshwater green microalgae *Chlorella vulgaris*. The impacts of NPs on *C. vulgaris* were measured as function of concentration (1, 50 and 100 µg ml⁻¹) and time (24, 48, 72 and 96 h) in Bold's basal medium (BB) or in natural water (Seine River). We analyzed the cytotoxic response of *C. vulgaris* cells to NPs by investigating the zeta potential, trypan blue exclusion assay, photosynthetic activity, superoxide dismutase (SOD) activity, quantification of Intracellular levels of Adenosine 5'-triphosphate (ATP) levels and microscopic investigations. Our data confirm that both MWCNTs and cotton CNFs under determined conditions are cytotoxic to *C. vulgaris*. Exposure to MWCNT and cotton CNF led to reductions on algal growth and cell viability. NPs exposure induced ROS release and decreased ATP levels. The addition of NPs further induced ultrastructural damage cell. MWCNTs penetrate the cell membrane and individual MWCNTs are seen in the cytoplasm while no evidence of cotton CNFs was found inside the cells. Cellular uptake of MWCNT was observed in algae cells cultured in BB culture medium, but cells cultured in Seine river water did not internalize MWCNTs.

Keywords: Nanoparticles, uptake, nanotoxicity, microalgae

APENDICE C- Artigo submetido à *Nature Communications* – 2013

Efficient delivery of DNA into bovine preimplantation embryos by multiwalled carbon nanotubes

Humberto M. Brandão^{1*}, Michele M. Pereira², Bruno C. Carvalho¹, Luis S. A. Camargo^{1*}, Nádia R. B. Raposo^{2,3}, Raquel V. Serapião¹, Carolina C. R. Quintão¹, Juliana Polisseni¹, Jaqueline S. Soares⁴, Ado Jório⁴, Luiz O. Ladeira^{4*}

¹Embrapa Gado de Leite, Rua Eugenio do Nascimento, 610, Juiz de Fora, MG, 36038-330, Brazil;

²Departamento de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, 36036-330, Brazil;

³Laboratório de Neurociências-LIM27-Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 01060-970, Brazil; ⁴Departamento de Física, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 30123-970, Brazil

*Emails: humberto.brandao@cnpqgl.embrapa.br; luiz.camargo@cnpqgl.embrapa.br; loladeira@gmail.com

Abstract

Introduction of foreign genes into target cells is a crucial step for achievement of gene therapy and production of human proteins for the pharmaceutical in biofactories. The pellucid zone (PZ) is a protective embryonic cells barrier against chemical, physical or biological substances. This put, usual transfection methods are not efficient for mammal's oocytes and embryos as they are exclusively for somatic cells. Carbon nanotubes have emerged as a new method for gene delivery and they can be an alternative for embryos transfection, but its ability to cross the PZ and mediated gene transfer is unknown. Our aim was to evaluate whether multiwall carbon nanotubes (MWNT) could cross the PZ, delivery of plasmid DNA (pDNA) and the potential effects on embryo viability. Bovine embryos were exposed to 0.2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ MWNT for 72 h under embryo culture conditions and Raman spectroscopy was performed to detect the carbon nanotubes. To study the ability of MWNT delivery DNA, the embryos were *in vitro* exposed for 12h to complexes pDNA-MWNT. In order to evaluate the effects of MWNT on embryonic development, analysis of embryo hatching and degeneration, *in situ* apoptosis and expression of genes associated with apoptosis (*BAX*) or response to stress (*HSP70.1*; *PRDX1*) were performed. Our data confirm that MWNTs can cross the PZ delivery of pDNA into *in vitro*-fertilized bovine embryos. The degeneration rate and the expression of genes associated to cell viability were not affected in blastocyst exposed to MWNTs. Those blastocysts, however, had lower cell number and higher apoptotic cell index than the blastocysts in the control group. This work shows the potential utility of the MWNT for the development of new non-viral vectors for delivery of molecules into bovine embryos.

APENDICE D- Resumos Expandidos publicados em anais de congressos

1. PEREIRA, M. M. ; GERN, J.C. ; BARBOSA, N. R. ; SOUZA, E. D. ; MATTOSO, L.H.C. ; Camargo, L.S.A ; LADEIRA, L.O. ; BRANDÃO, H.M. . Expressão gênica de biomarcadores de estresse e multipotência em embriões mamíferos expostos à nanofibras de celulose e à nanotubos de carbono. In: VII Workshop de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio, 2013, São Carlos. Anais do VII Workshop de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio. São Carlos: Embrapa Instrumentação, 2013.

2. PEREIRA, M. M. ; BARBOSA, N. R. ; BRAYNER, R. ; OLIVEIRA, V. ; QUINTÃO, C.C.R. ; CAMARGO, L. S. A. ; MATTOSO, L.H.C. ; BRANDÃO, H.M. . Nanofibras de celulose modulam a expressão de genes envolvidos na resposta ao estresse celular e apoptose em fibroblastos mamíferos. In: VII Workshop de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio, 2013, São Carlos. Anais do VII Workshop de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio. São Carlos: Embrapa Instrumentação, 2013.

3. PEREIRA, M. M. ; DA ROCHA, A. ; YEPREMIAN, C. ; COUTE, A. ; MOUTON, L. ; BARBOSA, N. R. ; MATTOSO, L.H.C. ; BRANDÃO, H.M. ; BRAYNER, R. . Impacto de nanofibras de celulose na viabilidade celular e na capacidade fotossintética da microalga *Chlorella vulgaris*. In: VII Workshop de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio, 2013, São Carlos. Anais do VII Workshop de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio. São Carlos: Embrapa Instrumentação, 2013.

4. PEREIRA, M. M. ; BRANDÃO, H.M. ; BARBOSA, N. R. ; NUNES, J.D. ; TEIXEIRA, E.M. ; CAMARGO, L. S. A. ; MATTOSO, L.H.C. . Análise da interação de nanofibras de celulose e fibroblastos bovinos por citometria de fluxo. In: VI Workshop da Rede de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio, 2012, Fortaleza. Anais do ... Workshop da Rede de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio. São Carlos: Embrapa Instrumentação, 2012. v. 1. p. 437-439.

5. PEREIRA, M. M. ; BRANDÃO, H.M. ; BARBOSA, N. R. ; QUINTÃO, C.C.R. ; TEIXEIRA, E.M. ; CAMARGO, L. S. A. ; MATTOSO, L.H.C. . Toxicidade de nanofibras de celulose em cultura de fibroblastos bovinos. In: VI Workshop da Rede de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio, 2012, Fortaleza. Anais do ... Workshop da Rede de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio. São Carlos: Embrapa Instrumentação, 2012. v. 1. p. 443-445.

6. PEREIRA, M. M. ; BRANDÃO, H.M. ; BARBOSA, N. R. ; CARVALHO, B. C. ; VASCONCELOS, A.J. ; SOARES, J.S. ; CAMARGO, L. S. A. ; LADEIRA, L.O. . Estudo da interação de nanotubos de carbono com embriões de mamíferos utilizando espectroscopia Raman. In: VI Workshop da Rede de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio, 2012, Fortaleza. Anais do ... Workshop da Rede de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio. São Carlos: Embrapa Instrumentação, 2012. v. 1. p. 446-448.

7. PEREIRA, M. M. ; BARBOSA, N. R. ; CAMARGO, L. S. A. ; ARAÚJO, T.D. ; LADEIRA, M.S. ; LADEIRA, L.O. ; BRANDÃO, H.M. . Transfecção gênica em fibroblastos bovinos utilizando nanotubos de carbono multicamadas. In: VI Workshop da Rede de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio, 2012, Fortaleza. Anais do ... Workshop da Rede de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio. São Carlos: Embrapa Instrumentação, 2012. v. 1. p. 431-433.

APENDICE E- Resumos publicados em anais de congressos

- 1. PEREIRA, M. M. ; DA ROCHA, A. ; MOUTON, L. ; YEPREMIAN, C. ; BARBOSA, N. R. ; BRANDÃO, H.M. ; BRAYNER, R. .** Toxicity of carbon nanotube and cellulose nanofiber to *Chorella vulgaris* green algae. In: XII Brazilian MRS Meeting, 2013, Campos do Jordão. XII Brazilian MRS Meeting, 2013.
- 2. PEREIRA, M. M. ; COUTE, A. ; LADEIRA, L.O. ; MATTOSO, L.H.C. ; BARBOSA, N. R. ; BRANDÃO, H.M. ; BRAYNER, R. .** Carbon nanotube and cellulose nanofiber: ecotoxicological effects. In: XII Brazilian MRS Meeting, 2013, Campos do Jordão. XII Encontro da SBPMat, 2013.
- 3. PEREIRA, M. M. ; BRANDÃO, H.M. ; BRAYNER, R. ; SOUZA, E. D. ; TEIXEIRA, E.M. ; CAMARGO, L. S. A. ; MATTOSO, L.H.C. ; BARBOSA, N. R. .** High concentration of cellulose nanofibers affect expression of genes involved in the cellular stress response and apoptosis in mammalian dermal fibroblast. In: XI Brazilian MRS Meeting, 2012, Florianópolis. Anais XI Encontro da SBPMat, 2012.
- 4. PEREIRA, M. M. ; QUINTÃO, C.C.R. ; BRANDÃO, H.M. ; BARBOSA, N. R. ; RABELO, N.C. ; BRITO, S.G. ; VIANA, J. H. M. ; LADEIRA, L.O. ; CAMARGO, L. S. A. .** Toxicidade de nanotubos de carbono em fibroblastos bovinos. In: XXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões (SBTE), 2011, Cumbuco. Acta Scientiae Veterinariae (Online). Porto Alegre, 2011. v. 39. p. 441-441.
- 5. PEREIRA, M. M. ; BRANDÃO, H.M. ; BARBOSA, N. R. ; SERAPIAO, R. V. ; CARVALHO, B. C. ; CAMARGO, L. S. A. ; LADEIRA, L.O. .** Gene expression and apoptosis in bovine preimplantation embryo exposed to carbon nanotubes. In: NANOAGRI, 2010, São Pedro. International Conference on Food and Agriculture Applications of Nanotechnologies, 2010. v. 1. p. 238-238.
- 6. PEREIRA, M. M. ; BRANDÃO, H.M. ; BARBOSA, N. R. ; QUINTÃO, C.C.R. ; TEIXEIRA, E.M. ; DA SILVA, S.R. ; MOREIRA, A.P. ; CAMARGO, L. S. A. ; MATTOSO, L.H.C. .** Cell viability in bovine dermal fibroblast cells exposed by nanocellulose fibers. In: 7º Seminário Internacional de Nanotecnologia, Sociedade e Meio Ambiente, 2010, Rio de Janeiro. Seminário Internacional de Nanotecnologia, 2010.
- 7. PEREIRA, M. M. ; BRANDÃO, H.M. ; BARBOSA, N. R. ; QUINTÃO, C.C.R. ; DA SILVA, S.R. ; RABELO, N.C. ; CAMARGO, L. S. A. ; LADEIRA, L.O. .** Effect of carboxylate multi-walled carbon nanotubes on the cell viability in bovine dermal fibroblast. In: 7º Seminário Internacional de Nanotecnologia, Sociedade e Meio Ambiente, 2010, Rio de Janeiro. Seminário Internacional de Nanotecnologia, 2010.