



Universidade Federal de Pernambuco
Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami
Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde

RENATA ALMEIDA RAELE

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE *QUANTUM DOTS*, *IN VITRO*, EM
CÉLULAS RAW 264.7**

Recife
2013

RENATA ALMEIDA RAELE

AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE *QUANTUM DOTS*, *IN VITRO*, EM
CÉLULAS RAW 264.7

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, do Laboratório de Immunopatologia Keizo Asami, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia Aplicada à Saúde.

Orientação:
Profa. Dra. Célia M. M. B. De Castro

Co-Orientadora:
Profa. Dra. Adriana Fontes

Recife
2013

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Raele, Renata Almeida

Avaliação da citotoxicidade de *Quantum Dots*, *in vitro*, em células Raw 264.7/ Renata Almeida Raele– Recife: O Autor, 2013.

77 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Célia M. M. B. de Castro

Coorientadora: Adriana Fontes

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Biologia Aplicada à Saúde, 2013.

Inclui bibliografia

- 1. Nanocristais 2. Toxicidade- testes 3. Macrófagos I. Castro, Célia M. M. B. de (orientadora) II. Fontes, Adriana (coorientadora) III. Título**

620.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB- 2013- 352

Universidade Federal de Pernambuco
Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami
Pós-Graduação em Biologia Aplicada à saúde

Renata Almeida Raelle

AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE *QUANTUM DOTS*, *IN VITRO*, EM
CÉLULAS RAW 264.7

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pernambuco para a
obtenção do título de Mestre em Biologia Aplicada à Saúde

APROVADA

Recife, 17 de Setembro de 2013


Prof^a. Dr^a. Regina Célia Bressan Queiroz de Figueiredo
Instituto de Pesquisas Aggeu Magalhães - Fiocruz-PE


Prof^a. Dr^a. Giovannia Araujo de Lima Pereira
Departamento de Química Fundamental
Universidade Federal de Pernambuco


Prof^a. Dr^a. Célia M. M. B. De Castro
Departamento de Medicina Tropical
Universidade Federal de Pernambuco
(Orientadora)

Recife
2013

*" Give me reason, but don't give me choice.
Cause I'll just make the same mistake again."*

James Blunt, 2007.

Recife
2013

AGRADECIMENTOS

Deixo aqui registrada toda a minha Gratidão e Carinho por aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho. Sem quaisquer um de vocês não seria possível a realização deste sonho.

Agradeço à Profa. Dra. Adriana Fontes, Co-Orientadora deste trabalho, por ter me acolhido e me recebido em seu laboratório, que mesmo sem muitas referências e me apoiou e guiou durante todo o caminho.

Obrigada à todos do Laboratório de Biofísica-Química, principalmente àqueles que contribuíram diretamente com o meu crescimento: Paulo Euzébio, Thiago Gomes, Diogo Lins, Isabela Andrade, Anna Lívia Linard, Maria Aparecida Seabra, Rogério Tavares e as Profas. Dras. Cláudia Sampaio e Beate Saessenger.

Agradeço à Profa. Dra. Célia Maria Machado Barbosa de Castro, minha Orientadora, a oportunidade que me foi dada com a abertura das portas do laboratório. Todo este tempo em que trabalhei aqui foi essencial para meu amadurecimento profissional e pessoal. Por isso, sou eternamente grata.

Agradeço aos Profs, Drs. Luiz Bezerra de Carvalho - Coordenador de Pós-Graduação - e José Luiz de Lima Filho - Diretor do LIKA - por terem me aceitado e me recebido em suas casas (o LIKA) e pela confiança em mim depositada.

À toda a equipe que compõe o Laboratório de Microbiologia do LIKA, em especial aqueles com tive mais convivência, Thacianna Costa, Liliane Melo, Nathália Gomes e Danielly Cantarelli . Também têm minha gratidão Eliete Rodrigues, Rafael Padilha, Sr. Edson, Sr. Otaviano à quem sempre recorri para resolução de problemas técnicos.

Obrigada aos integrantes do Laboratório de Toxicologia e de Eletrofisiologia do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Em especial O Prof. Dr. Demétrius Araújo, Juan Gonçalves e Hervé Couliadiati aos quais serei eternamente grata pela hospitalidade e pelo conhecimento compartilhado.

Recife
2013

Obrigada à Profa Regina Bressan, do Instituto de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz - PE por seus conselhos, que tanto acrescentaram à este trabalho.

Aos meus amigos Guilherme Oliveira, Ketlin Ribas, Sarah Palácio, Mariana Campos, Rebeca Medeiros, Mara Luiza, Rodrigo Aguar, que perto ou longe sempre estiveram em meu coração.

E por último, porém não menos importante, à minha Família. Obrigada à minha mãe, Suzana Almeida, pela paciência e dedicação à mim todos esses anos. E Obrigada também à Etiene Cavalcante pelo apoio em todos os domingos passados na Universidade.

Obrigada à Yves Thiago Cavalcante Rodrigues, pelo apoio incondicional, pelo amor e carinho, pelo suporte e paciência à mim dados. Sem você este trabalho seria metade o que é, pelo seu simples incentivo e confiança em mim depositados. Te amo.

RESUMO

Quantum Dots (QDs) são nanocristais fluorescentes de semicondutores que vêm ganhando espaço em Ciências da Saúde como sondas fluorescentes para estudos de sistemas biológicos tanto *in vitro* como *in vivo*. Entretanto, para assegurar sua aplicabilidade em organismos vivos, são necessários testes de avaliação de toxicidade. Tendo em vista estes aspectos, o objetivo deste trabalho foi avaliar e comparar o efeito de diferentes concentrações de QDs de CdTe e ZnSe funcionalizados com Ácido Mercaptopropiônico (AMP) e/ou Ácido Mercaptosuccínico (AMS) sobre cultura de macrófagos da linhagem RAW 264.7, células imuno efectoras que desempenham papel relevante na defesa do organismo frente a patógenos. Para tanto, foram realizados testes de: (1) viabilidade celular através de MTT para definição de IC₅₀ em 24 horas de exposição aos QDs, (2) viabilidade por exclusão de Iodeto de Propídio (PI) e análise de ciclo celular por PI na IC₅₀ por 24 horas, e por fim (3) avaliação dos níveis de Ca²⁺ citoplasmático utilizando o *Fluo-3*. O teste estatístico utilizado foi One-Way ANOVA com nível de significância $p \leq 0,05$. O teste MTT mostrou que após um período de 24 h de exposição aos QDs de CdTe houve redução da viabilidade para ~35 e 70% nas concentrações máximas e mínimas utilizadas (35,3±2% e 71±3,5% respectivamente) sendo a IC₅₀ obtida para em ~76 nM (AMP=51,7±3,5% e AMS=56,3±8,6%). Essa toxicidade se apresentou de forma dose-dependente. Já o ZnSe se mostrou menos tóxico com IC₅₀ em ~380 nM (48,7±11,3%). A análise da viabilidade com PI em 76 nM para todas as nanopartículas, indicou que não há lesão significativa da membrana plasmática após 24 h de incubação. O teste de ciclo celular, também em 76 nM, indicou que as amostras expostas aos QDs de CdTe apresentaram mais *debris* (AMP=27,4±3,8%; AMS=28,4±3,9% e C=4,4±1,3) e menos células em S e G2 (AMP=7,3±0,3 e 4,7±0,5%; AMS=7,6±0,6 e 3,9±0,5% e C=16,1±2,3 e 13±1,7 % respectivamente). Já os resultados de ZnSe não diferiram do controle. As análises com *Fluo-3* mostraram, para os QDs de CdTe, um aumento significativo de cálcio citoplasmático a partir da concentração de 76 nM (AMP=263,1±17,8; AMS=255,1±16,2 e C=102,5±6,5). Entretanto para o ZnSe só foi observado aumento significativo desse íon para concentrações a partir de 260 nM (ZnSe=188±15,8 e C=107,2±4,6). Concluímos que QDs de CdTe apresentam toxicidade consideravelmente maior que de ZnSe para as células RAW 264.7, independente do agente estabilizante/funcionalizante ou tamanho do QD. Isso indica que a toxicidade está provavelmente ligada à liberação do Cádmio. Com relação ao CdTe, acredita-se que danos posteriores à membrana plasmática nessas células podem ser reflexo dos eventos precoces ocorridos na mitocôndria e nos níveis de Ca²⁺. Por fim, de acordo com os resultados apresentados, observamos que a morte celular de RAW 264.7 devido à exposição aos QDs é um evento crescente e contínuo diretamente relacionado com o tempo de exposição e com a concentração de QDs ministrada.

Palavras-Chave: Quantum Dots, Toxicidade, Macrófagos

ABSTRACT

Quantum Dots (QDs) are fluorescent semiconductor nanocrystals that have been considered important fluorescent probes for studies of biological systems both *in vitro* and *in vivo* in Health Sciences. However, to ensure its applicability in living organisms, tests are needed to evaluate toxicity. In this context, the aim of this study was to evaluate and compare the effect of different concentrations of CdTe and ZnSe QDs with Mercaptopropionic Acid (MPA) and/or Mercaptosuccinic Acid (MSA) functionalization, on cultured RAW 264.7 macrophage lineage, immune effectors cells important to the organisms' defense. For this, the tests performed by us were: (1) cellular viability by MTT to define IC₅₀ after 24 hours of exposure to the QDs, (2) viability by Propidium Iodide (PI) and analysis of the cell cycle by PI in the IC₅₀ for 24 hours, and (3) evaluation of cytoplasmic Ca²⁺ (in 2 hours with 5 concentrations of QDs) by using *Fluo-3*. The statistical test used was one-way ANOVA with significance level of $p \leq 0.05$. The MTT assay showed that after a 24 h of exposure to the CdTe QDs the viability decreased to ~35 and 70% at maximum and minimum concentrations used (35.3 and 71+2%+3.5%, respectively) with an IC₅₀ obtained at ~76 nM (MPA=51.7+3.5=56.3% and 8.6% MSA). This toxicity was presented in a dose- dependent way. It was shown that the ZnSe was less toxic with IC₅₀ ~380 nM (48.7+11.3%). The viability by PI with 76 nM, indicate no significant injury to the plasma membrane after 24 hours of incubation for all types of nanoparticles. The test of cell cycle, also at 76 nM, indicated that samples exposed to the CdTe QDs showed more *debris* (MPA=27.4±3.8%; MSA=28.4±3.9% e C=4.4±1.3) and less cells in S and G2 (MPA=7.3±0.3 e 4.7±0.5%; MSA=7.6±0.6 e 3.9±0.5% e C=16.1±2.3 e 13±1.7% respectively). However the results of ZnSe did not differ from the control. Analyses with *Fluo-3*, for the CdTe QDs, showed a significant increase in cytoplasmic calcium from the concentration of 76 nM (MPA=263.1±17.8; MSA=255.1±16.2 e C=102.5±6,5). However for ZnSe significant increase was observed only for ion concentrations from 260 nM (ZnSe=188±15.8 e C=107.2 ±4.6). We conclude that CdTe QDs exhibit considerably toxicity, higher than ZnSe for RAW 264.7 cells, independent of the stabilizer/functionalizing agent or the QD size. This indicates that the toxicity is probably linked to the release of Cadmium. In respect to CdTe, we believe that upcoming damages to the plasma membrane could reflect the events that occur early in the mitochondria and in the Ca²⁺ levels. Finally, in accordance with the presented results, we observed that the RAW 264.7 cell death due to exposure to QDs is a continuous and growing event directly related to the exposure time and the concentration of QDs provided.

KeyWords: Quantum Dots, Toxicity, Macrophage.

Lista de Abreviaturas

AMP.....	Ácido Mercaptopropiônico
AMS.....	Ácido Mercaptosuccínico
BC.....	Banda de Condução
<i>BG</i>	<i>Band Gap</i>
BV.....	Banda de Valência
DMEM.....	Dubelcco Midium Eagle Modified
DMSO.....	Dimetil Sulfóxido
DNA.....	Ácido Desoxi-riboNucleico
G1.....	Fase Gap 1 (Ciclo Celular)
G2.....	Fase Gap 2 (Ciclo Celular)
IC ₅₀	Concentração Inibitória
IP3.....	Inisitol3- Fosfato
LPS.....	Lipopolissacarídeo
M.....	Fase Mitose (Ciclo Celular)
MTT. 3-[4,5-dimethylthiazol-2yl]-2,5- diphenyltetrazolium bromide thiazolyl blue	
NO.....	Óxido Nítrico
PI.....	Iodeto de Proídeo
<i>QDs</i>	<i>Quantum Dots</i>
ROS.....	<i>Reactive Oxygem Species</i>
rpm.....	Rotações por minuto
S.....	Fase de Síntese (Ciclo Celular)
SFB.....	Soro Fetal Bovino

Lista de Figuras

Fig. 1: Cristais visualizados sob excitação em diferentes comprimentos de onda. Da esquerda para à direita: luz branca e diferentes comprimentos de onda no espectro de luz UV (<i>Electric LadyLand Museum</i>).19
Fig. 2: (a) Exemplos de cristais artificiais macroscópicos, sintetizados quimicamente em laboratório. Entre eles um cristal de CdTe, o qual dá origem à pontos quânticos; (b) <i>Bulk</i> de CdTe; (c) <i>Bulk</i> de ZnSe. (<i>The Crystal Growth Laboratory</i> , 2013)20
Fig. 3: Discretização dos níveis energéticos dos cristais de semicondutores de acordo com o tamanho da partícula (adaptado de <i>Sigma-Aldrich</i>).20
Fig.4: Relação entre tamanho da nanopartícula e seu espectro de emissão (cor).21
Fig.5: Exemplo da fluorescência de <i>QDs</i> de CdTe sintonizável com o tamanho. Comprimento de excitação: 365 nm.21
Fig. 6. Espectros de absorção (a) e emissão (b) de Rodamina 6G e <i>QDs</i> de CdSe. O espectro de emissão do <i>QD</i> é estreito na largura à meia altura do pico, enquanto o seu perfil de absorção é amplo e contínuo, o que significa que o <i>QDs</i> é mais eficientemente excitado em qualquer comprimento de onda inferior a 530 nm. Em contraste, a Rodamina 6G, corante orgânico, tem um perfil de excitação estreito e largo espectro de emissão [5].22
Fig.7: Representação esquemática da estrutura do <i>QD</i>23
Fig. 8: Estrutura molecular dos estabilizantes mais comuns: (a) ácido 3-mercaptopropiônico (AMP); (b) ácido mercaptossucínico (AMS).24
Fig.9: Desenho esquemático das fases do ciclo celular.30
Fig.10: esquema exemplificando as fases do ciclo celular e a quantidade de DNA presente em cada uma delas. Observe que em G2 há o dobro de DNA que em G1 enquanto que em S há uma quantidade intermediária. Após a finalização da Mitose em G2 a célula entra em G1 novamente com quantidade inicial de DNA. (Adaptado de www.sobiologia.com.br).32
Fig.11: Representação esquemática do Desenho do Estudo.36
Fig.12: Esquema da síntese de <i>QDs</i> de CdTe/CdS. Etapa I à esquerda; etapa II à direita.37

Fig.13: Tubos de filtração <i>Pierce Protein Concentrator</i> (adaptado de: www.thermoscientific.com)40
Fig.14: Representação da estrutura blenda de zinco. Representação dos átomos de Zinco em cinza e átomos de Selênio em Laranja. (Adaptado de www.Wikipedia.com)41
Fig. 15: aspecto de cultivo celular oriunda do Banco de Células do Rio de Janeiro (esquerda). Imagem das células em microscopia óptica (direita)44
Fig.16: Células plaqueadas em placas de 06 poços (esquerda). Garrafas de Cultura e placas de 06 poços durante incubação em estufa de CO ₂ (direita).45
Fig.17: Amostras de <i>QDs</i> concentradas e estéreis prontas para uso.46
Fig.18: Plaqueamento das células para citometria de fluxo.47
Fig.19: Placas para microscopia cm 10 ⁶ células aderidas e estimulas por <i>QDs</i>48
Fig.20: Absorbância (seta) em 491 nm e um pico de emissão em 550 nm. Excitação em 365 nm.50
Fig. 21: Caracterização óptica de CdTe/CdS-AMS mostrando o primeiro pico de absorbância (seta) em 555 nm e um pico de emissão em 600 nm. Excitação em 365 nm.51
Fig. 22: Caracterização óptica de ZnSe/ZnS-AMS mostrando o primeiro pico de absorbância (seta) em 400 nm e um pico de emissão em 440 nm. Excitação em 315 nm.52
Fig.23: Gráfico de viabilidade celular após 24 horas de exposição aos <i>QDs</i> de CdTe/CdS-AMP53
Fig. 24: Gráfico de Viabilidade celular após 24 horas de exposição aos <i>QDs</i> de CdTe/CdS-AMS.53
Fig. 25: Gráfico de Viabilidade celular após 24 horas de exposição aos <i>QDs</i> de ZnSe/ZnS-AMS.54
Fig. 26: Gráficos de citometria de fluxo mostrando a intensidade de fluorescência de células marcadas e não marcadas pelo PI. Atenção especial para a ausência de fluorescência em M2 para todos os grupos: (a) controle negativo; (b) células expostas à 10 ¹³ <i>QDs</i> de AMP/ mL (76 nM) por 24 horas; (c) células expostas à	

10 ¹³ QDs de AMS/ mL (76 nM) por 24 horas; (d) células expostas à 10 ¹³ QDs de ZnSe/ mL (76 nM) por 24 horas.	56
Fig. 27: Efeito dos QDs sobre o ciclo celular.	59
Fig 28: Gráfico de citometria mostrando os picos de fluorescência em cada fase do ciclo celular. (a) Controle, (b) CdTe-AMP, (c) CdTe-AMS e (d) ZnSe. Onde M1, M2, M3 e M4 se referem a: <i>debris</i> , G1, S e G2/M respectivamente.	60
Fig. 29: Gráfico mostrando a intensidade de fluorescência emitida devido à ligação do Fluo-3 com o Ca ²⁺ liberado, após 2 horas de exposição por diferentes concentrações de QDs de CdTe-AMP.	61
Fig. 30: Variação da intensidade de fluorescência de acordo com a concentração de QDs de CdTe-AMP.	62
Fig. 31: Gráfico da liberação de cálcio citoplasmático após 2 horas de exposição aos QDs de CdTe- AMS.	63
Fig. 32: Imagens de células marcadas com Fluo3 e expostas aos QDs de CdTe/CdS-AMS.	64
Fig. 33: Gráfico de intensidade de fluorescência após exposição das células à QDs de ZnSe por 2 horas	65
Fig. 34: Imagens de células marcadas com Fluo3 e expostas à QDs de ZnSe/ZnS-AMS.	65
Figura 35: Marcação com CdTe/CdS-AMP após 24 horas de exposição em microscopia confocal. Excitação em 488 nm. Escala = 30 µm.	66
Figura 36: Marcação de células com CdTe/CdS-AMS após 24 horas de exposição em microscopia de fluorescência. Filtros L5 e TX2. Escala = 20 µm.	67
Figura 37: Marcação de células com ZnSe após 24 horas de exposição. Excitação em 405 nm por microscopia confocal. Escala: 45 µm.	67

Sumário

Introdução.....	16
Objetivos.....	18
Fundamentação Teórica.....	19
Luminescência e Fluorescência	19
<i>Quantum Dots</i>	20
Toxicidade.....	24
Macrófagos.....	27
Ciclo Celular	29
Técnicas de Análise de Citotoxicidade	30
Metodologia.....	35
Desenho do Estudo.....	35
Síntese de <i>Quantum Dots</i>	37
Caracterização Óptica dos <i>Quantum Dots</i>	39
Purificação e Esterilização	39
Padronização do Número de Partículas	40
Cultivo Celular	43
Incubação com Nanopartículas	45
MTT.....	46
Integridade de Membrana Plasmática e Análise de Ciclo Celular.....	47
Análise de Cálcio.....	48
Análise por Microscopia de Fluorescência e Confocal à Laser	48
Resultados e Discussão	50
Caracterização Óptica dos <i>Quantum Dots</i>	50
MTT.....	53
Análise de Membrana	53
Análise de Ciclo Celular por PI.....	58
Análise de Cálcio.....	61
Análise por Microscopia de Fluorescência e Confocal à Laser	66
Conclusão.....	68

***Perpectivas*.....70**

***Referências*.....71**

1. INTRODUÇÃO

A luz é uma radiação eletromagnética, situada entre o infravermelho e ultravioleta, que vem sendo utilizada como meio de estudo de variados fenômenos desde os primeiros trabalhos no ramo da Ciência. No estudo da biologia ela está presente desde os primeiros microscópios ópticos, onde se puderam observar estruturas basais de tecidos e células, até as mais refinadas técnicas atuais de aquisição de imagens e de análises, tais como a microscopia confocal, microscopia de fluorescência e pinças ópticas.

Porém, para se fazer uso destas tecnologias sofisticadas de aquisição de imagens microscópicas é necessário o uso conjunto de elementos que permitam o contraste entre as diferentes estruturas da amostra - como células e organelas, fibras e matrizes. E assim, podemos citar os mais diferentes tipos de corantes: corantes tradicionais, fosforescentes e fluorescentes, como os *Quantum Dots* (QDs).

Na procura de metodologias mais estáveis que nos permitam a aquisição de dados, os QDs vêm ganhando destaque. São nanocristais fluorescentes de semicondutores em escala nanométrica, que sofrem reduzida fotodegradação e possuem propriedades interessantes para a aquisição de imagens. Os QDs possuem de 1 a 10 nm de diâmetro, e apresentam com um largo espectro de absorção. Seu tamanho define o comprimento de onda de emissão, permitindo assim que partículas do mesmo material produzam fluorescências variadas. Além disto, estas partículas podem ser funcionalizadas com moléculas orgânicas que lhe confirmam função específica de acordo com o objetivo de uso.

Devido ao fato de sofrerem fotodegradação reduzida em relação aos corantes fluorescentes tradicionais, e possuir um largo espectro de absorção, o que permite que vários QDs possam ser excitados com um único laser, os QDs têm ganhado destaque na marcação de sistemas biológicos tanto *in vitro* como *in vivo*. Após conjugação destas nanopartículas com biomoléculas, eles podem ser utilizados para a elucidação de mecanismos celulares e tissulares, para o diagnóstico de patologias e inclusive para tratamento.

Como seu uso na biologia é recente, muitos aspectos a respeito da sua interação com o sistema biológico como também da sua influência sobre o metabolismo celular ainda permanecem sem compreensão. Os estudos sobre sua

toxicidade são variados, porém ainda há muito a se entender sobre os mecanismos que regem a dinâmica da interação dos *QDs* em células, tecidos e organismos. Tendo em vista seu potencial uso como sonda fluorescente, é importante conhecer as alterações que a nanopartícula pode provocar sobre o objeto de estudo.

Morte celular, produção de espécies reativas do oxigênio (ROS), produção de Óxido Nítrico (NO, *Nitric Oxide*), além de danos ao DNA como metilação de histonas e fragmentação do material genético, e promoção de inflamação são alguns dos eventos causados pelos *QDs* já descritos na literatura. A mitocôndria é tida como um dos primeiros alvos da toxicidade enquanto se especula sobre a elevação dos níveis de cálcio na presença de nanopartículas, porém os mecanismos que desencadeiam estas respostas não estão muito bem elucidados.

Para estudar estes efeitos sobre o metabolismo celular, alguns sistemas biológicos são de particular interesse. Entre eles estão o cultivo de células primárias (extraídas diretamente de organismos vivos) ou imortalizadas (células transformadas e de crescimento indefinido em cultura) provenientes de tecidos-chave para o organismo, como por exemplo, hepatócitos, células epidermáticas, células nervosas, células de mucosa intestinal ou células imunes efectoras (fagócitos mononucleares).

As células imunes efectoras, como os Macrófagos, se mostram em destaque, pois são elas que irão promover a defesa do hospedeiro na presença de um agente agressor ao organismo, como um patógeno, uma célula tumoral ou uma partícula inerte como um *QD*, utilizando mecanismos como a fagocitose, produção de Óxido Nítrico e de citocinas mediadoras da inflamação, além da produção de ROS. Portanto esta célula é alvo de vários testes de toxicidade e proliferação celular para assegurar o uso de drogas, compostos inorgânicos e agentes químicos com potencial medicamentoso.

Dentro deste contexto iremos focar este trabalho na análise dos possíveis efeitos causados pelos *Quantum Dots* sobre culturas de macrófagos imortalizados, a fim de tentar elucidar os mecanismos envolvidos na agressão causada por estas nanopartículas sobre o sistema biológico em questão.

2. OBJETIVOS

Geral:

Avaliar a citotoxicidade de *Quantum Dots* hidrofílicos de CdTe/CdS-AMP, CdTe/CdS-AMS e ZnSe/ZnS-AMS sobre cultura de células RAW 264.7

Específicos:

Caracterizar opticamente *Quantum Dots* de CdTe/CdS-AMP, CdTe/CdS-AMS e ZnSe/ZnS-AMS;

Avaliar o efeito dos diferentes *QDs* sobre a viabilidade celular de macrófagos através da técnica do MTT.

Avaliar os possíveis efeitos de *QDs* sobre a integridade da membrana plasmática de macrófagos.

Avaliar os possíveis efeitos de *QD* sobre o DNA dos macrófagos.

Avaliar os possíveis efeitos dos *QDs* sobre os níveis intracelulares de Cálcio.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Luz, Luminescência e Fluorescência

Luz visível é uma onda eletromagnética, com comprimentos determinados dentro do intervalo para o qual o olho humano é sensível. É uma radiação eletromagnética com comprimentos de onda que vão da radiação infravermelha até a radiação ultravioleta. A luminescência é emissão de luz em determinado comprimento de onda apresentada por certas substâncias quando estimuladas (Kurt Nassau, 2003).

A fluorescência é um tipo específico do fenômeno de luminescência. É a emissão de radiação eletromagnética visível quando a molécula é excitada pela luz, e que perdura enquanto a excitação estiver presente. Ela ocorre porque, sob o efeito da radiação, elétrons absorvem energia e passam do chamado estado fundamental para o estado excitado. Ao voltar ao estado fundamental, uma das formas de se liberar o excesso de energia é na forma de radiação eletromagnética. Na fluorescência, esse processo ocorre em frações de segundos e se encerra imediatamente com a retirada da fonte de excitação (Serviço geológico do Brasil, 2013). Na Figura 1 encontram-se exemplos de cristais fluorescentes.

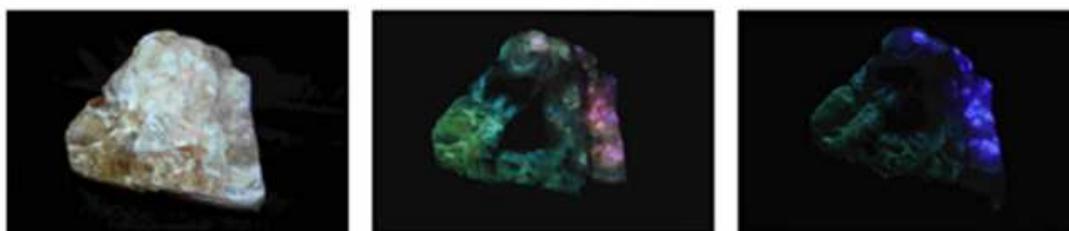


Fig. 1: Cristais visualizados sob excitação em diferentes comprimentos de onda. Da esquerda para à direita: luz branca e diferentes comprimentos de onda no espectro de luz UV (*Electric LadyLand Museum*).

3.2. *Quantum Dots*

Pontos Quânticos ou *Quantum Dots* (QDs) são cristais de semicondutores fluorescentes em escala nanométrica (nanocristais). Apresentam diâmetros da ordem de 1 a 10 nm, ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$) e são constituídos de poucas centenas a

poucos milhares de átomos, exibindo propriedades ópticas que são significativamente diferentes quando comparadas aos mesmos cristais em escala macroscópica, chamados "bulk" (Fig.2) (Santos, *et al*, 2008).

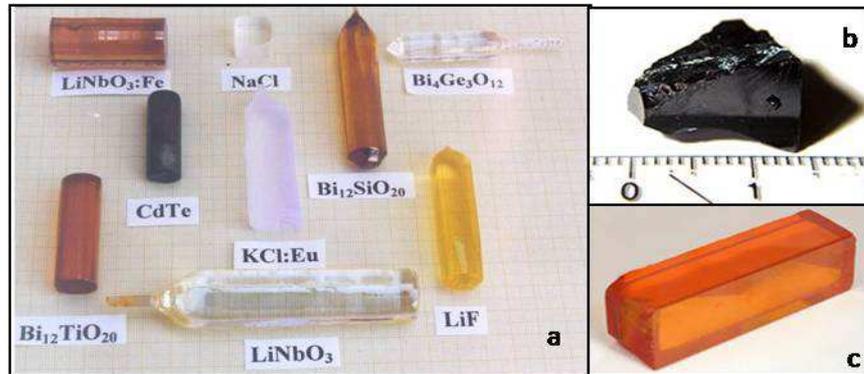


Fig. 2: (a) Exemplos de cristais artificiais macroscópicos, sintetizados quimicamente em laboratório. Entre eles um cristal de CdTe, o qual dá origem à pontos quânticos; (b) *Bulk* de CdTe; (c) *Bulk* de ZnSe. (*The Crystal Growth Laboratory*, 2013)

Os materiais semicondutores possuem uma estrutura composta de uma Banda de Valência (BV) ocupada por elétrons, uma Banda de Condução (BC) sem elétrons, e por um *Band Gap* (BG), uma banda de energia proibida ao elétron entre as bandas BV e BC. Com o efeito da diminuição do tamanho dos materiais semicondutores para a escala nanométrica, ocorre um alargamento do *Band Gap* e o aparecimento de níveis discretos ao final das bandas BC e BV (Fig.3) (Santos *et al*, 2008).

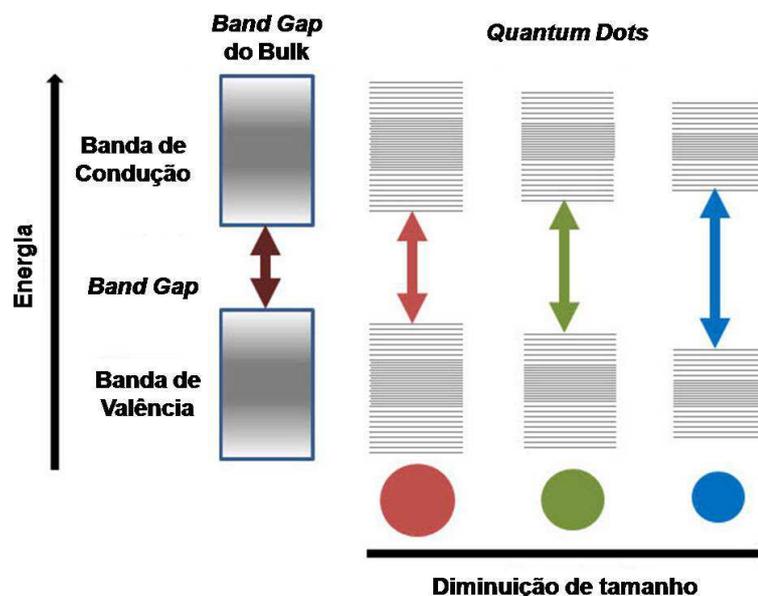


Fig. 3: Discretização dos níveis energéticos dos cristais de semicondutores de acordo com o tamanho da partícula (adaptado de *Sigma-Aldrich*).

Quando um fóton de luz visível atinge esses materiais, elétrons da BV são excitados e migram para a BC, atravessando o *BG*. Porém sua permanência no estado excitado é curta, e os elétrons acabam retornando ao seu estado inicial. Neste retorno, o elétron libera parte da energia adquirida em forma de fluorescência. Devido à emissão estar associada à energia do *BG*, quanto maior a diferença energética entre BV e BC, menor será o comprimento de onda e vice versa. Uma vez que a energia do *BG* irá variar de acordo com o tamanho da nanopartícula, podemos "sintonizar" o comprimento de onda do fóton emitido com o diâmetro do cristal (Fig. 4) (Jamieson *et al*, 2007).

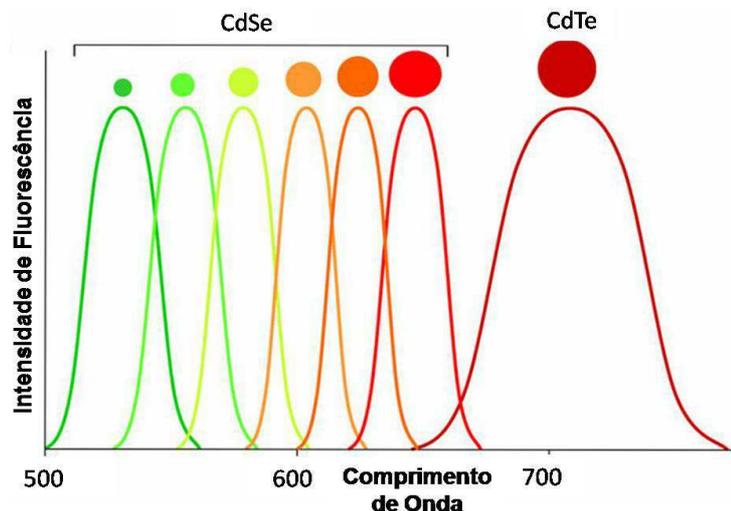


Fig.4: Relação entre tamanho da nanopartícula e seu espectro de emissão (cor)

Estes semicondutores (Fig. 5), quando em escala nanométrica, apresentam propriedades diferentes de seus similares macroscópicos, propriedades estas que são de grande interesse quando se trata de sondas biológicas.



Fig.5: Exemplo da fluorescência de *QDs* de CdTe sintonizável com o tamanho. Comprimento de excitação: 365 nm.

Entre as características que tornam os *QDs* interessantes como sondas fluorescentes estão: (1) o largo espectro de absorção, que permite que vários tipos de *QDs* que emitem luz em diferentes regiões do visível sejam excitados simultaneamente utilizando apenas um comprimento de onda; (2) seu relativo estreito espectro de emissão, facilitando a distinção entre cada tipo de *QD*, o que pode ser controlado pela variação do tamanho do nanocristal, (3) sua fluorescência intensa possui relativa fotoestabilidade (Fig. 6) (Chan *et al* 2002; Lira *et al*, 2010 ; Han *et al*, 2001).

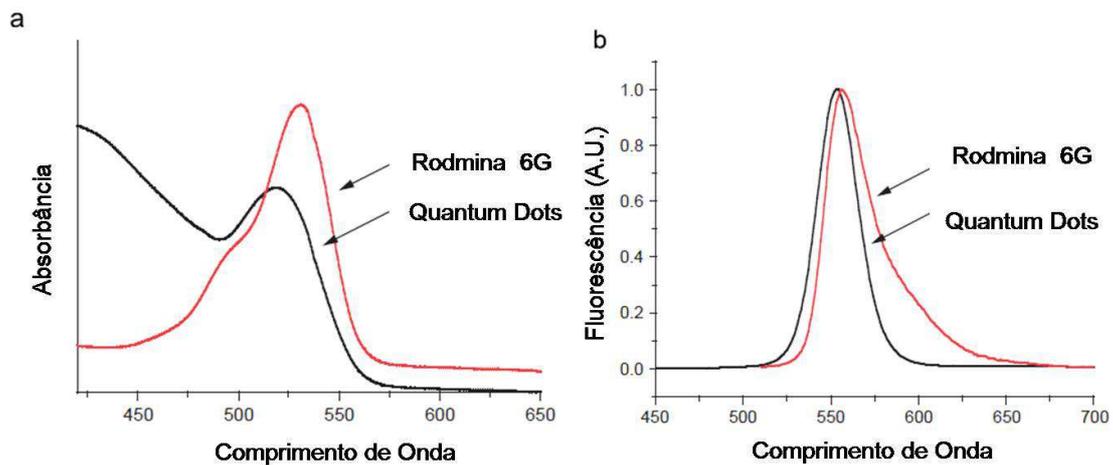


Fig. 6. Espectros de absorção (a) e emissão (b) de Rodmina 6G e *QDs* de CdSe. O espectro de emissão do *QD* é estreito na largura à meia altura do pico, enquanto o seu perfil de absorção é amplo e contínuo, o que significa que o *QDs* é mais eficientemente excitado em qualquer comprimento de onda inferior a 530 nm. Em contraste, a Rodmina 6G, corante orgânico, tem um perfil de excitação estreito e largo espectro de emissão (Chan *et al*, 2002).

Enquanto isso, os corantes orgânicos convencionais possuem estreito espectro de absorção, exigindo um estímulo por luz de um comprimento de onda específico, que varia de corante para corante. Isto implica na necessidade de uma fonte de luz específica para cada reagente com que se trabalha (Jamieson *et al*, 2007). Estes corantes também possuem um espectro de emissão largo, ou seja, seus espectros podem sobrepor-se, impedindo de se visualizar variadas estruturas biológicas com precisão e sem superposição de sinais. Isto limita o número de sondas fluorescentes que podem ser utilizadas para marcar diferentes moléculas biológicas simultaneamente (Jamieson *et al*, 2007; Michalet *et al*, 2005; Xiao *et al*, 2010).

Os QDs também são conhecidos como átomos artificiais, pois em escala nanométrica estão sob ação do Efeito Quântico, onde ocorre a discretização dos níveis energéticos (Fig. 3). Como são nanopartículas muito pequenas, modificações ocorridas em sua superfície se tornam bastante relevantes. Aspectos como ligações não compartilhadas de átomos da superfície, ou características do meio em que estão, podem provocar diminuição de sua fluorescência (Santos *et al*, 2008). Para refazer as ligações não compartilhadas dos átomos de sua superfície, comumente recobrem-se os cristais (núcleo) com outro semiconductor de com BG de energia maior (*casca*), processo chamado de passivação. Os nanocristais resultantes são então chamados de *núcleo/casca* (Fig.7) e são mais fluorescentes.

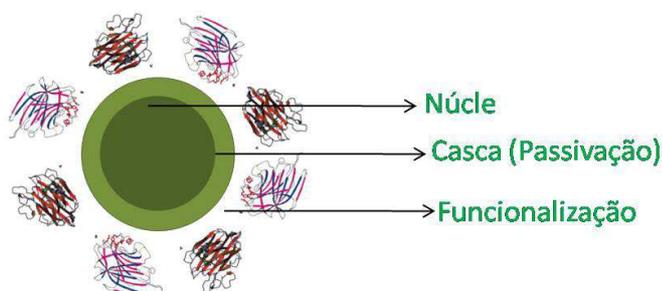


Fig.7: Representação esquemática da estrutura do QD.

Durante a síntese dos nanocristais é comum se adicionar ao meio um agente estabilizante, que irá agir de forma a evitar a precipitação das nanopartículas (Santos *et al*, 2008; Han *et al*, 2001). Os agentes estabilizantes mais utilizados nas sínteses hidrofílicas são o Ácido Mercaptopropiônico (AMP) e o Ácido Mercaptosuccínico (AMS) (Fig. 8).

Ambos possuem dupla função devido à presença de um grupamento contendo Enxofre e um grupamento Carboxílico. Os átomos de enxofre formam ligações covalentes com os átomos de Cádmiu do núcleo que possuem ligações livres, e deste modo é formada a camada de passivação de CdS. Por outro lado, estes mesmos estabilizantes possuem um grupamento carboxílico que irá funcionar tanto como agente estabilizante, como funcionalizante e nele ainda é possível se ligar outras biomoléculas como proteínas e lipídeos (Rogach *et al*, 2007).

A Cisteamina é outro agente estabilizante de função dupla que pode ser utilizado na estabilização e funcionalização das nanopartículas. Ela possui um grupamento Tio, que irá participar da passivação, e um grupamento amina, o qual confere carga positiva ao QD em pH neutro.

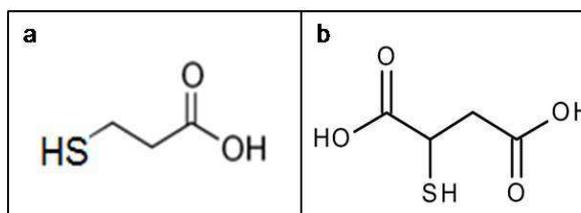


Fig. 8: Estrutura molecular dos estabilizantes mais comuns: (a) ácido 3-mercaptopropiônico (AMP); (b) ácido mercaptosuccínico (AMS).

Além da funcionalização com AMS e AMP, pode-se também recobrir concomitantemente a nanopartícula com moléculas de interesse específico, como por exemplo, proteínas, lipídios e fármacos, processo chamado de bioconjugação, e é utilizado para atribuir função específica à nanopartícula. Exemplos de bioconjugação com *Quantum Dots* são a utilização de anticorpos para marcação específica e identificação de estruturas (Wu *et al*, 2003; Dahan *et al*, 2003; Lidke *et al*, 2004).

3.3 Toxicidade

Devido às suas propriedades ópticas, os *QDs* estão sendo amplamente utilizados em vários campos da biologia. Seus usos vão desde a utilização de *QDs* como sondas fluorescentes para a marcação de células (Wu *et al*, 2003; Dahan *et al*, 2003; Lidke *et al*, 2004), ensaios dinâmicos (Parak *et al*, 2002) ou entrega de genes (Kleina *et al*, 2009) até sua associação com nanopartículas magnéticas para agentes de contraste em imagens de ressonância magnética (Okamatsu *et al*, 2013; Pankhurst, *et al* 2003). Além de serem utilizados em culturas celulares, os *QDs* têm sido introduzidos com sucesso em experiências com animais para marcação específica *in vivo* (Ballou *et al*, 2004; Kim *et al*, 2004) e o uso futuro em aplicações clínicas é previsto (Alivisatos, 2001). Logo, é evidente que para qualquer aplicação clínica a biocompatibilidade das nanopartículas é crucial.

Visto que *QDs* são diferentes do seu *bulk* devido ao seu tamanho, é uma questão óbvia se perguntar sobre os potenciais perigos decorrentes da sua

miniaturização (Service, 2000). Podemos pensar em pelo menos quatro diferentes meios pelos quais QDs, introduzidos no organismo podem interferir com a funcionalidade do sistema biológico e, finalmente, levar ao declínio de seu metabolismo: (1) nanopartículas podem ser compostas de materiais tóxicos. Este é o caso, por exemplo, de nanopartículas de CdSe e CdTe. Dentro do organismo, íons tóxicos são libertados, e provocam morte celular. Efeitos tóxicos de íons cádmio e outros materiais são conhecidos e descritos na literatura (Kondoh *et al*, 2002; Limaye e Shaikh, 1999; Rikans e Yamano, 2000; Santone, *et al*, 1982; Lopez *et al*, 2003); (2) A deposição e impregnação das nanopartículas sobre o sistema biológico podem causar danos, independente do material utilizado na composição dos QDs. Sabe-se que nanopartículas podem aderir à superfície de membranas celulares por adsorção (Ghitescu e Fixman, 1984; Jordan *et al*, 1999), além de serem também endocitados pelas células (Parak *et al*, 2002; Jordan *et al*, 1999; Kloefer *et al*, 2003). A adesão à membrana celular e o armazenamento de partículas no interior das células podem ter efeitos prejudiciais, mesmo para partículas inertes que não se decompõem ou reagem; (3) A forma da nanopartícula tem influência sobre sua toxicidade. Partículas de mesmo material, mas de formas diferentes podem ter efeito tóxico exacerbado por uma ou outra forma. Tem sido relatado que os nanotubos de carbono podem perfurar células como se fossem agulhas. (Lam *et al*, 2004; Warheit *et al*, 2004). Em estudo com nanotubos de carbono em pulmão, foi mostrado que estas nanopartículas são significativamente mais tóxicas do que nanopartículas de grafite, ou seja, do mesmo elemento, porém em formato diferente (Lam *et al*, 2004); (4) O tipo de recobrimento utilizado para funcionalizar estas partículas é crucial para a determinação da sua toxicidade. Em um estudo comparativo de QDs funcionalizados com agentes de cargas opostas - ácido mercaptopropiônico (AMP) de carga negativa e Cisteamina (Cys) de carga positiva, ambas em pH neutro - foi mostrado que a funcionalização com Cys tornou a partícula menos tóxica. Uma vez que sua carga é positiva, as interações QDs-células ocorreram de forma menos agressiva, e a metabolização da nanopartícula foi mais facilmente conduzida. Além disto, a carga positiva ajudou a neutralizar radicais livres produzidos pelo estresse oxidativo causado pelo próprio QD (Derfus *et al*, 2004).

Em 2004, Derfus *et al* relataram que partículas de CdSe dispersas em meio aquoso liberam íons Cd^{2+} e que a concentração dos íons se correlaciona

diretamente com os efeitos tóxicos provocados. Os mesmos autores demonstraram que a liberação de íons é aumentada pela oxidação, quer pela exposição ao ar ou a radiação UV, mas é diminuída por encapsulação dos *QDs* com passivações adequadas, tal como ZnS (Derfus *et al*, 2004).

Tang *et al.* mostraram a neurotoxicidade de *QDs* de CdSe em cultura de neurônios do hipocampo. Foi observada morte celular dose-dependente com 24 horas de exposição contínua aos *QDs* (Tang *et al*, 2008). Ming *et al.*, em 2011, mostrou que a exposição à concentrações, mesmo baixas, de *QDs* são capazes de reduzir a viabilidade de células endoteliais, provocar estresse oxidativo com liberação de ROS, fragmentação da mitocôndria e quebra de potencial de membrana mitocondrial, além disso os *QDs* iniciam mecanismos apoptóticos mitocondriais (Ming Yana *et al*, 2011). Diferentes núcleos e revestimentos de *QDs* já se sabem ser tóxicos para culturas primárias de hepatócitos de ratos (Shiohara *et al*, 2004). Além disso, foi demonstrado que a base de cádmio dos *QDs* induz a perda dramática de células no pâncreas, células de carcinoma (PANC-1), células de feocromocitoma de rato (PC12) e células microgliais de murino (N9) (Lovric *et al*, 2005; Chang *et al.*, 2009).

A toxicidade dos *QDs* pode ser alterada por modificações de superfície (Chan *et al*, 2012) sugerindo que as superfícies reativas podem desempenhar um papel importante na citotoxicidade de *QD* (Lovric *et al*, 2005; Chang *et al.*, 2009). Quando revestidos com proteínas ou polímeros biocompatíveis, *QDs* são menos prejudiciais para as células e organismos. No entanto, quando *QDs* são retidos nas células ou acumulados no corpo durante um longo período de tempo, os revestimentos são degradados pelos mecanismos de defesa do organismo. Estes *QDs* têm então seus núcleos expostos, provocando estresse oxidativo, induzindo danos a frações subcelulares que culminam com morte celular por apoptose não clássica (Lovric *et al*, 2005; Chang *et al.*, 2009; Choi *et al*; 2007).

Muitos são os estudos que relatam efeitos tóxicos dos *QDs* em nível celular, subcelular, protéico e em DNA (Wang *et al*, 2010; Lu *et al*, 2010). Segundo eles, os *QDs* podem entrar nas células através de endocitose ou provocar danos à membrana plasmática, mitocôndria e núcleo, conduzindo à apoptose celular ((Ming Yana *et al*, 2011; Shiohara *et al*, 2004; Lovric *et al*, 2005; Chang *et al.*, 2009; Valadares , 2006; Choi *et al*; 2007). Ao nível protéico, os *QDs* podem se ligar à

albumina do soro humano, e formar complexos de proteína-QDs que levam a mudanças conformacionais, tanto em nível secundário quanto em nível de estrutura terciária (Xia *et al*, 2008). Ao nível de DNA, QDs podem lesar o DNA devido à geração de radicais livres (Green e Howmam, 2005).

Embora estes estudos toxicológicos (Derfus *et al*, 2004; Tang *et al*, 2008; Su *et al*, 2009) mostrem a toxicidade dos QDs como resultado da sua exposição em sistemas biológicos, o entendimento do seu mecanismo ainda permanece limitado (Tang *et al*, 2008). E para tal, é imprescindível a compreensão de seus efeitos sobre o sistema imune e suas células. Embora haja estudos em macrófagos (Zheng *et al*, 2007; Li *et al*, 2013; Higuchi *et al*, 2008), estes são escassos e tratam puramente da marcação de nanopartículas sobre as células. Poucos são os que tratam seus efeitos sobre o metabolismo deste sistema (Martin *et al*, 2010).

3.4. Macrófagos

Os macrófagos são células de defesa, amplamente distribuídas pelo organismo, que recebem diferentes nomes de acordo com a sua localização. Alguns exemplos são: microglia no Sistema Nervoso Central, células de Kupffer no fígado, macrófagos alveolares no pulmão, células dendríticas na região subcortical dos linfonodos e células de Langerhans na pele (Imunologia Celular, 2005).

São células relativamente grandes, que medem entre 25-50 μm de diâmetro, apresentam núcleo irregular, possuem um ou mais nucléolos, cromatina pouco condensada, citoesqueleto bem desenvolvido, inúmeras projeções citoplasmáticas, grande número de lisossomos, complexo de Golgi e mitocôndrias (Auger *et al* 1992). Eles são, sem dúvida, um dos mais importantes tipos de células do sistema imune inato e podem assumir formas morfológicas diferentes conforme sua localização (Halliwell *et al*, 1999).

Os macrófagos podem exercer a função de defesa de maneira indireta, por meio de atividades antitumorais e microbicidas, da secreção de citocinas, da apresentação de antígenos, regulando assim o sistema imune (Klimp *et al*, 2001) ou de forma direta, identificando, fagocitando e destruindo efetivamente corpos estranhos. Desta forma, o macrófago tem papel central no início da resposta inata e

adquirida e a efetividade da resposta contra patógenos depende da sua forma de ativação (Dinarello, 1996).

A fagocitose desenvolvida pelos macrófagos compõe o início do conjunto das atividades biológicas de toda a resposta imunológica e da resposta inata, e é constituída pelas etapas: aderência ao substrato, quimiotaxia, ingestão de células e partículas inertes e produção radicais livres (Sporn *et al*, 1990; De La Fuente *et al*, 1991; Holgate *et al*, 1996; Aderem *et al*, 1999; Zapolska-Donar *et a*, 2000). Há "espraiamento" do macrófago, com alteração da forma (arredondada para achatada), e conseqüente aumento da área de contato da membrana plasmática com o substrato a ser fagocitado, e redistribuição das organelas citoplasmáticas.

Durante a etapa de aderência ao substrato, ocorre a ativação de receptores para moléculas de adesão, como fibronectina, vibronectina e laminina, ocasionando rearranjo do citoesqueleto celular para que ocorra a fagocitose (Sampaio, 2005). Com a internalização do patógeno (que pode ser um microorganismo ou um corpo estranho, assim como uma nano ou micropartícula), há a formação de uma vesícula onde o agente agressor permanece confinado, e esta fica acessível ao endossoma (Swanson e Baer, 1995). Por meio de uma série de eventos de fusão, a membrana vesicular e o conteúdo do endossoma fusionam-se para formar o fagolisossoma.

Funcionalmente, após ingestão da partícula e formação do fagolisossoma, ocorre a "explosão respiratória", resultando em aumento no consumo de oxigênio e na geração de ROS. O ânion Superóxido (O_2^-) é o principal radical livre produzido, e a partir dele são gerados outros íons poderosos no defesa do organismo, como o OH^- e o NO que combinados produzem radicais peroxinitrito (NO_3^-) e também H_2O_2 altamente ativos na eliminação de patógenos invasores, atacando microrganismos e/ou células infectadas, mas que em excesso pode lesar células vizinhas, causando dano além de defesa (Bauerle *et al*, 1996; Pithon-Curi *et al*, 1995; imunologia celular, 2005). Desta forma, linhagens macrofágicas são de grande interesse para obtenção de informações sobre a resposta produzida frente à presença de "agentes agressores" desconhecidos em organismos.

Dentre as linhagens imortalizadas de macrófagos disponíveis, se destaca as RAW 264.7, oriundas de células tumorais peritoneais induzidas por vírus (*Abelson Leukemia Virus*) em ratos (Raschke *et al*, 1978). Estas células são aderentes, apresentam alta taxa de fagocitose e de multiplicação. São resistentes e

relativamente fáceis de cultivar. São interessantes para testes de toxicidade, pois apresentam metabolismo que mimetiza macrófagos de culturas primárias, porém não sofrem fase de declínio no seu crescimento, por serem imortalizadas.

3.5. Ciclo Celular

Num organismo pluricelular, os mecanismos de divisão celular são essenciais para permitir a embriogênese, crescimento e reparação após perda de células. A vida de uma célula é ritmada pelo ciclo celular, onde cada célula de um organismo sofre modificações cíclicas que a conduzem à divisão celular e à formação de duas células-filhas. Portanto a análise do ciclo celular é um passo importante para a compreensão das vias de ativação e proliferação das células (Poirier *et al*, 2003). Em células cultivadas *in vitro*, informações sobre o ciclo celular são importantes no sentido de assegurar o crescimento sadio de uma população.

O ciclo celular eucariótico (Fig. 9) é compreendido em dois períodos: interfase (Fase G1; Período S; Fase G2) e mitose (M). A interfase é caracterizada pela intensa atividade metabólica e preparação para divisão celular. Ela abrange três períodos, G1, S, e G2 e, a identificação destas fases pode ser obtida por meio da marcação e quantificação de DNA nuclear de células em suspensão, com Iodeto de Propídeo (PI).

Em **G1** não ocorre síntese de DNA. São produzidas moléculas de RNA no citoplasma, as quais promoverão a síntese de proteínas. A célula cresce em volume e torna-se grande, com o dobro das proteínas iniciais.

Na fase **S** ocorre a síntese de DNA no interior do núcleo. Nesta fase a quantidade de DNA presente é maior que em G1, porém menor que em G2.

Em **G2** não há mais síntese de DNA, porém há mais material genético que em S e o dobro em relação à G1. Aqui se reinicia a produção de RNA, formando mais proteínas para um novo período de crescimento celular. A célula entra em uma situação de desequilíbrio entre superfície e volume que obriga a célula a iniciar o processo de divisão (Giacomello Campeol, 2013).

A **Mitose** é o processo pelo qual uma célula se divide em duas outras novas células iguais. É importante no crescimento dos organismos multicelulares e nos processos de regeneração de tecidos do corpo. Uma célula dividindo-se por mitose

dará origem a duas outras células, com o mesmo número de cromossomos da célula inicial.

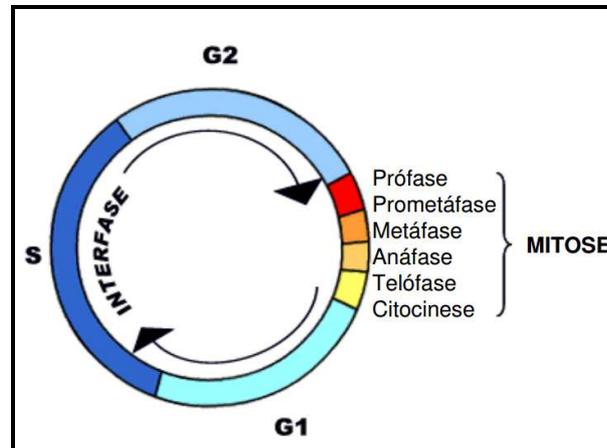


Fig. 9: Desenho esquemático das fases do ciclo celular.

A regulação adequada do ciclo celular, com o controle correto da síntese de substâncias reguladoras (ciclina dependentes de quixases - CDK) e inibidoras (inibidores de CDK), é fundamental para o desenvolvimento normal dos organismos multicelulares. Uma falha nesse controle pode acarretar uma superprodução desnecessária de células, frequentemente com resultados maléficos, como a formação de tumores (câncer) (Biologia Celular e Molecular, 2005).

A dinâmica do processo de divisão celular é muito complexa. Ela ocorre por meio de uma série de eventos e processos nucleares e citoplasmáticos de forma coordenada e possui mecanismos de controle rigoroso envolvendo genes e proteínas regulatórias que atuam em diferentes etapas do ciclo celular. Em cultura, as células de uma população normalmente apresentam-se em diferentes fases de ciclo celular. Se todas as células de determinada população estivessem na mesma etapa do ciclo celular, essa população estaria em sincronismo celular. Uma variedade de técnicas e substâncias pode sincronizar células em fases específicas do ciclo celular (Biologia Celular e Molecular, 2005).

3.6 Técnicas de análise de Citotoxicidade

A citotoxicidade basal é definida como “os efeitos adversos resultantes da interferência com estrutura e/ou processos celulares essenciais para a sobrevivência, proliferação e/ou função comum a todas as células do organismo” (Ekwall, B. 1999)

A avaliação da citotoxicidade basal é importante, uma vez que as funções celulares basais suportam as funções celulares órgãos-específicas. A citotoxicidade basal é expressa como IC₅₀ (concentração que inibe 50% das células quando comparado às células controle não-tratadas), a qual pode ser matematicamente calculada à partir da curva de dose-efeito. Vários métodos aplicados para testar a toxicidade geral são úteis na toxicologia *in vitro*. Como regra geral, as células são expostas a diferentes concentrações de um produto químico por um dado período de tempo, sendo posteriormente a função celular mensurada utilizando diferentes alvos. Os ensaios mais frequentemente empregados para a avaliação de citotoxicidade basal são, o teste de redução do tetrazolium MTT, o teste da captação do corante vital vermelho neutro (3-amino-m-dimetilamino-2-metilfenazina), liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH) e Azul de Tripán (Su *et al*, 2009).

3.6.1 MTT

O ensaio de MTT é utilizado para medir a viabilidade celular após tratamento com agentes estressantes. Ele se baseia no fato de o MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide thiazolyl blue) ser um sal tetrazolium que, após clivagem por desidrogenases presentes na mitocôndria de células viáveis, torna-se insolúvel em água pela formação de cristais de formazan, azuis, e solúveis em solventes orgânicos. Após adição de Dimetil Sulfóxido (DMSO - solvente orgânico) sobre as células, o MTT convertido em formazan é solubilizado e pode ser lido por espectrofotometria. Quanto maior for a absorbância lida, mais células funcionais haviam na amostra. E esta reação pode ser expressa em percentual de células vivas de acordo com a absorbância lida em 570 nm, obtendo-se o percentual da viabilidade celular (De Castro *et al*, 2004; Porto *et al*, 2011).

3.6.2 Iodeto de Propídeo

O Iodeto de Propídeo (PI) é um corante que intercala entre as bases nitrogenadas do DNA produzindo fluorescência que pode ser detectada e quantificada por equipamentos de análise de fluorescência. Ele possui um pico de absorção em 490 nm e um pico de emissão em 638 nm. O método de análise de

viabilidade pela exclusão do Iodeto de Propídeo (PI) é baseado no fato do PI ser um corante que se liga ao DNA, que porém, não é capaz de atravessar a membrana plasmática quando esta se encontra intacta (adaptado de www.ucl.ac.uk).

Quando uma célula se encontra sob estresse, alguns dos sistemas de transporte ativo são afetados, seguindo-se a despolarização da membrana citoplasmática (células intactas) e, mais tarde, a sua permeabilização (mortas). Assim, na presença de lesão membranar, o corante não mais consegue ser mantido fora da célula, se difundindo para o seu interior, até atingir o núcleo e se ligar ao DNA (adaptado de sobiologia.com.br).

A análise do ciclo celular de uma população de células pode também ser obtida por meio da marcação e quantificação de DNA nuclear com o PI. A premissa deste corante é que ele se liga proporcionalmente à quantidade de DNA presente na célula (Fig. 10). Células quiescentes e em G1 possuem apenas uma cópia de DNA e por conseguinte, possui intensidade de fluorescência X. Células em fase G2/M do ciclo celular possuem duas cópias de DNA e mostram intensidade de fluorescência 2X. Uma vez que as células na fase S estão sintetizando DNA, os valores de fluorescência estão entre as populações X e 2X. O histograma resultante consiste de três populações: duas curvas de Gauss (X e 2X picos) e uma da população em fase S (adaptado de www.ucl.ac.uk).

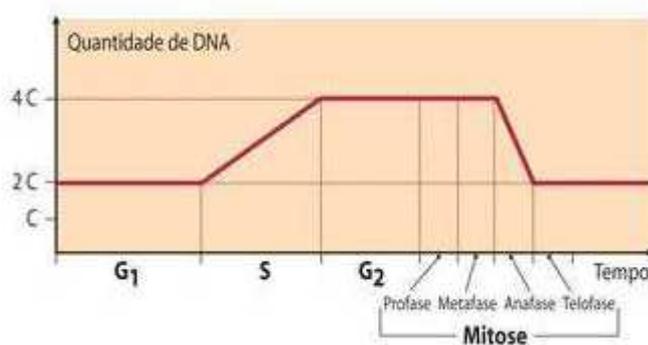


Figura 10: esquema exemplificando as fases do ciclo celular e a quantidade de DNA presente em cada uma delas. Observe que em G2 há o dobro de DNA que em G1 enquanto que em S há uma quantidade intermediária. Após a finalização da Mitose em G2 a célula entra em G1 novamente com quantidade inicial de DNA. (Adaptado de www.sobiologia.com.br).

3.6.3 Análise de Cálcio

O cálcio é essencial para várias funções celulares, como endocitose e exocitose, contração muscular, ativação de enzimas, regulação de mecanismos de morte, dentre outros. Entretanto, em excesso no citoplasma, é citotóxico. Assim, a célula dispõe de alguns mecanismos que mantêm os níveis intracelulares de cálcio dentro de uma faixa adequada de concentração, como por exemplo, as bombas de cálcio e de cálcio-sódio e o seqüestro de cálcio no retículo endoplasmático e na mitocôndria. Vários agentes tóxicos podem aumentar o cálcio intracelular, superando a capacidade da célula de regular sua concentração, e deste modo provocar danos ao seu metabolismo. A elevação do cálcio citoplasmático pode provocar (1) depleção das reservas de ATP: com a elevação dos níveis citoplasmáticos de cálcio, há diminuição da síntese do ATP e aumento do seu consumo. A diminuição da síntese ocorre tanto porque a captura do cálcio pela mitocôndria dissipa a força próton-motora da membrana quanto porque o cálcio ativa enzimas oxidativas que produzem espécies reativas lesivas à membrana. Já o aumento do consumo de ATP é provocado pelo aumento do trabalho dos transportadores de cálcio na tentativa de reduzir seus níveis citosólicos.(2) Dissociação dos microfilamentos: filamentos de actina mantêm a morfologia celular por ancoramento a proteínas presentes na membrana plasmática. O aumento do cálcio citoplasmático dissocia a actina dessas proteínas levando à formação de bolhas na membrana e predispondo-a a rupturas.(3) Ativação de enzimas hidrolíticas: existem proteases, fosfolipases, DNAses e RNAses cálcio-dependentes. A ativação sustentada dessas enzimas levará à citotoxicidade.(4) Geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio: o cálcio ativa enzimas envolvidas na geração de espécies reativas, como desidrogenases e xantina oxidases (Ward, 2004).

Algumas das causas do aumento da concentração do cálcio citoplasmático podem ser:

Aumento do influxo (entrada) de cálcio devido à abertura de canais iônicos de cálcio operados ou dano à membrana plasmática; diminuição do efluxo (saída) provocado por funcionamento inadequado dos transportadores responsáveis pela saída do cálcio da célula ou pela sua captura pelo retículo endoplasmático ou mitocôndria; mobilização de reservatórios intracelulares por agentes que lesem a membrana mitocondrial ou do retículo endoplasmático, ou que sejam agonistas do receptor para Inositol Trifosfato (IP3), o qual está acoplado a canais de cálcio na

membrana do retículo endoplasmático e cujo estímulo promove abertura desses canais com conseqüente saída do cálcio.

Como referido anteriormente, muitas funções celulares dependem do cálcio, mas em concentrações e locais adequados. Graças à toxicidade de elevadas concentrações citosólicas de Ca^{2+} , basta uma ligeira alteração nas vias sinalizadoras para provocar conseqüências devastadoras nas funções celulares: o excesso ou a deficiência de Ca^{2+} na altura e no local errados podem levar à rápida morte celular por necrose, ou à indução da morte celular programada (apoptose) (Giacomello e Campeol 2013; Ward, 2004).

O indicador de Ca^{2+} *Fluo-3* foi desenvolvido para uso com fontes de excitação da luz visível e pode ser utilizado em citometria de fluxo e microscopia de laser confocal. Desde que foi introduzido em 1989, imagens com *Fluo-3* revelaram a dinâmica espacial de muitos processos elementares na sinalização de cálcio (Life Technologies, 2013).

As propriedades mais importantes do *Fluo-3* são o fato de ter um espectro de absorção compatível com excitação a 488 nm por laser de argônio, e um grande aumento da intensidade de fluorescência em resposta à ligação do Ca^{2+} em 526 nm. O *Fluo-3*, *Fluo-4* e todos os seus derivados apresentam grande aumento de intensidade de fluorescência quando ligados ao Ca^{2+} . O aumento da intensidade de fluorescência na ligação com Ca^{2+} é tipicamente > 100 vezes.

Assim, a utilização do *Fluo-3* para marcação de Cálcio em testes de toxicidade pode revelar estágios precoces de respostas celulares frente à agente nocivos, sinalização celular e início de processos apoptóticos (Life Technologies, 2013).

4. METODOLOGIA

4.1 Desenho do Estudo

O estudo experimental utilizou células da Linhagem de Macrófagos RAW 264.7 como modelo celular para avaliar *in vitro*, o efeito causado pela administração de várias concentrações de *Quantum Dots* de CdTe/CdS-AMP, CdTe/CdS-AMS e ZnSe/ZnS-AMS, por um período de 2 e 24 horas de incubação, de acordo com o teste utilizado. As células foram divididas nos seguintes grupos, de acordo com o estímulo aplicado:

Grupo 1: CdTe/CdS-AMP

Grupo 2: CdTe/CdS-AMS

Grupo 3: ZnSe/ZnS-AMS

Após os períodos de incubação com as nanopartículas, as células foram testadas para os seguintes parâmetros: (1) MTT: Avaliação da viabilidade celular por atividade enzimática mitocondrial; (2) NO: Quantificação da produção de Óxido Nítrico pela reação de Griess; (3) Análise de Viabilidade com Iodeto de Propídeo (PI): Foi utilizada a citometria de fluxo para avaliação de viabilidade por dano à membrana plasmática utilizando PI; (4) Análise de Ciclo Celular: Avaliação de ciclo celular e fragmentação de DNA por citometria de fluxo utilizando PI e (5) Análise de Cálcio Citoplasmático: Marcação de Cálcio citoplasmático para identificação de alterações celulares precoces (Fig. 11).

Para todos os grupos de nanopartículas foram realizadas caracterizações ópticas dos *QDs* para obter informações sobre suas propriedades espectroscópicas, seu tamanho e sua concentração. Além disso, foi realizada a seqüência de testes acima para avaliar a resposta celular frente à nanopartícula.

Nos ensaios MTT e NO foram testadas 5 (cinco) concentrações diferentes de *QDs*, durante incubações de 24 horas, sendo no mínimo um N = 6 de amostras experimentais de todas as concentrações, além de 6 controles negativos e 6 positivos confeccionados utilizando Lipopolissacarídeo de *E. coli* (LPS) como agente ativador de macrófagos.

Nos ensaios de viabilidade e ciclo celular com o corante Iodeto de Propídeo por citometria de fluxo foi testada apenas uma concentração de cada nanopartícula. A

concentração escolhida foi a mais próxima possível da IC_{50} de acordo com o teste de MTT. Foi utilizado o número de $N = 3$, em duplicata, totalizando 6 amostras que foram incubadas por também por 24 horas.

Já no ensaio de análise de cálcio (utilizando-se o corante Fluo-3) foram testadas as 5 concentrações diferentes dos *QDs*, em incubações de 2 horas, com um $N = 3$ em duplicata também totalizando 6 amostras.

Além destes testes foram feitas imagens em microscopia confocal. Neste caso foi utilizada a maior concentração de nanopartículas aplicadas nos testes por um período de 24 horas de incubação.

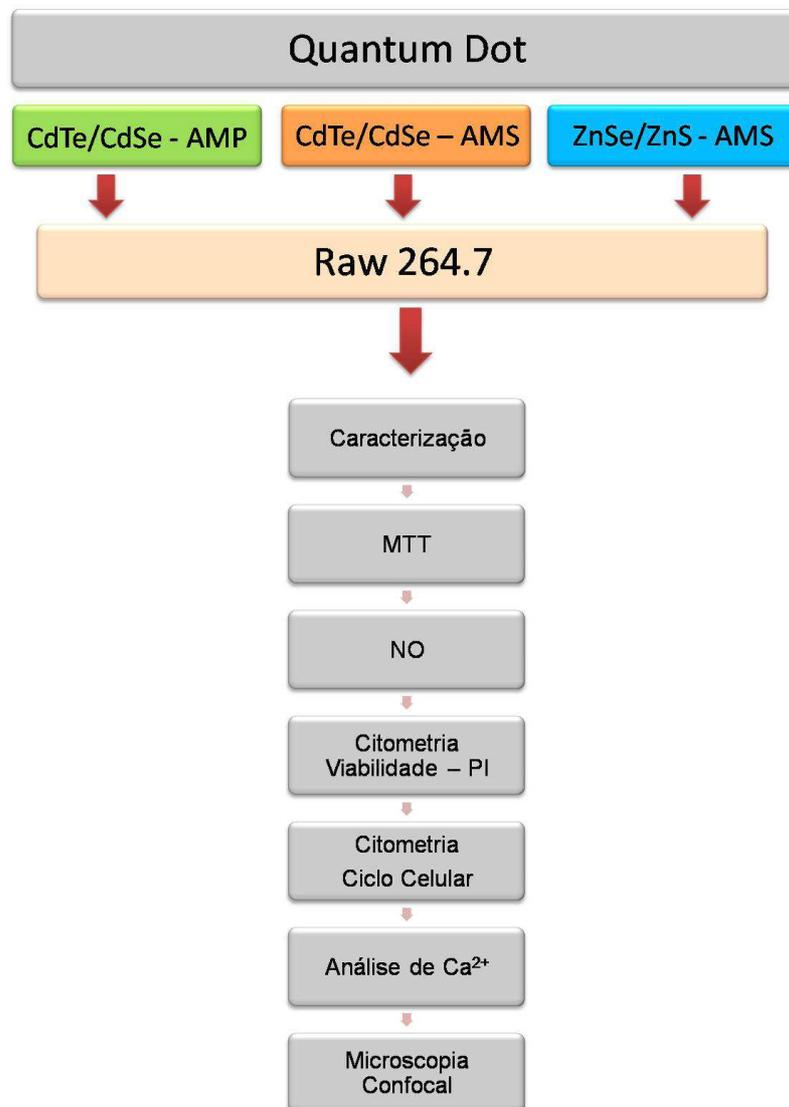


Fig. 11: Representação esquemática do Desenho do Estudo.

O teste estatístico utilizado para a comparação de resultados foi ANOVA e Tukey, onde o nível de significância foi $p < 0,05$. Todos os dados foram processados pelo Software *Origin*.

4.2 Síntese dos *Quantum Dots*

4.2.1 CdTe/CdS-AMP e CdTe/CdS-AMS

Para sintetizar as nanopartículas foram necessárias duas etapas distintas e complementares para ambos agentes estabilizantes (fig. 12).

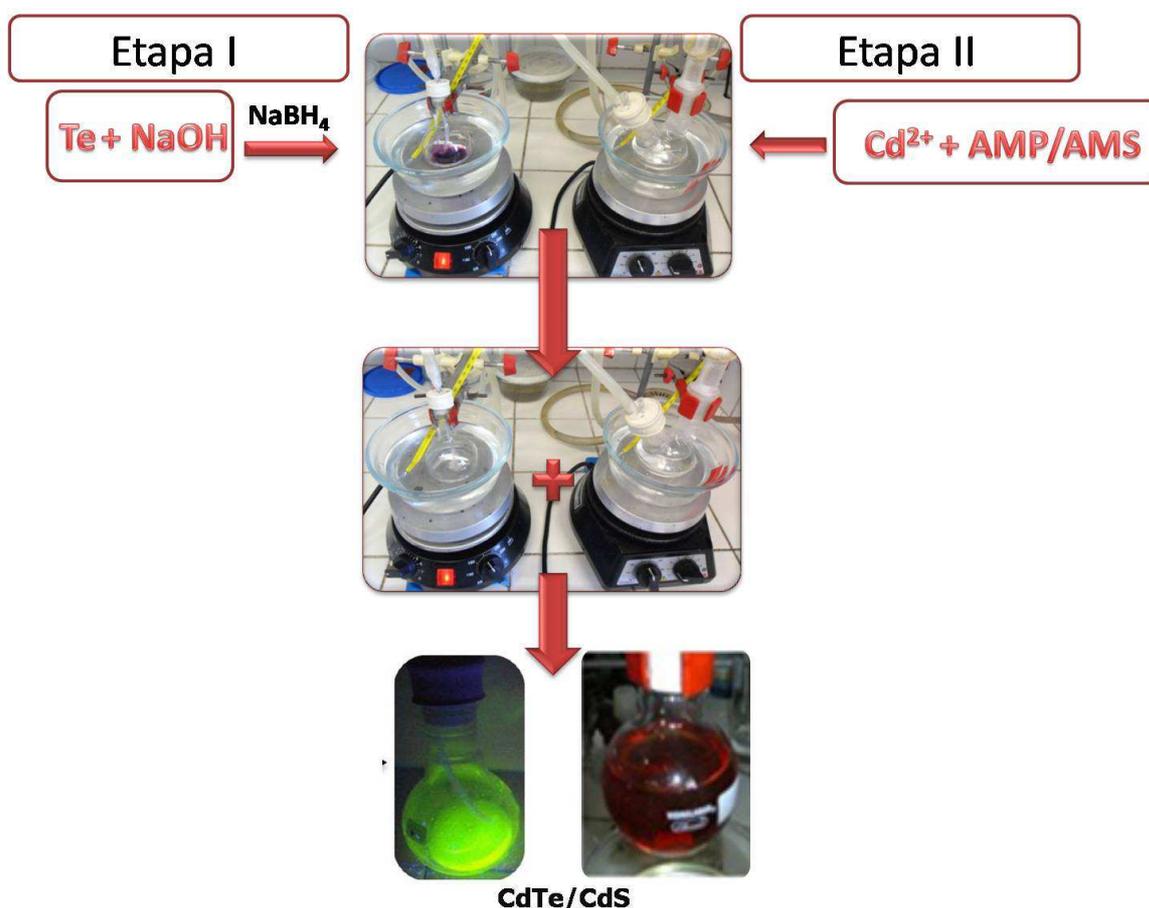


Fig.12: Esquema da síntese de QDs de CdTe/CdS. Etapa I à esquerda; etapa II à direita.

Na etapa I foi separada uma alíquota de 1,02 mL de solução de AMP (ácido 3-mercaptopropiônico) a 4,9%. Já para a preparação da solução de AMS foram diluídos 0,034 g de AMS em 5 mL de água ultrapura. Cada estabilizante foi

adicionado a 20 mL de solução de Perclorato de Cádmio ($\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2$) 0,01 M. Os pHs das soluções resultantes foram então elevados para 10,5 através da adição de NaOH 2 M, sob agitação. A solução formada de $\text{Cd}^{2+}/\text{AMP}$ ou $\text{Cd}^{2+}/\text{AMS}$ foi então aquecida lentamente até a temperatura final de 80 °C para ser usada na etapa seguinte.

Na etapa II preparou-se a solução de Telúrio reduzido, utilizada para a síntese. Foram adicionados 0,013 g de Telúrio metálico em 100 μL de NaOH 2 M. Em atmosfera de nitrogênio (necessária, pois a presença de O_2 interfere na redução do telúrio) adicionou-se a essa solução 0,144 g de Boridreto de Sódio (NaBH_4), que agiu como agente redutor, diluído em cerca de 5 mL de água ultrapura. A partir de então a temperatura foi elevada para 80 °C. O aumento da temperatura proporcionou a redução do Telúrio e é marcada pelo aparecimento de coloração violeta na solução (formação de Te^{-1} reduzido), seguida de transparência (Te^{-2}).

Para concluir a síntese, foi adicionada à solução de Telúrio reduzido (etapa II) a solução de $\text{Cd}^{2+}/\text{AMP}$ ou $\text{Cd}^{2+}/\text{AMS}$ (etapa I) e ambas permaneceram sob agitação e aquecimento (aproximadamente 90 °C) por 7 horas para QDs funcionalizados com AMS e 3 horas para os de AMP. Após este período, as partículas estavam já passivadas com CdS e estabilizadas com AMP ou AMS, que também agiram como agentes funcionalizantes (Santos *et al*, 2008). As proporções Cd:Te:Estabilizante foram 2:1:2,4 e 2:1:5,7 para os QDs de CdTe com AMS e AMP, respectivamente.

4.2.2 ZnSe/ZnS-AMS

A síntese de partículas de ZnSe é feita em duas etapas e é semelhante à síntese dos QDs de CdTe.

Etapa I: Foram pesados 0,0228 g de ácido mercaptosuccínico (AMS) e adicionados 50 mL de água ultrapura, posteriormente elevou-se o pH para 10,3 utilizando uma solução de NaOH 2 M. Em seguida adicionou-se 2,70 mL de solução de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ a 0,01 M e a mesma foi mantida sob aquecimento a 100 °C.

Etapa II: Consistiu na preparação da fonte de íons seleneto (Se^{2-}), na qual se pesou 0,001 g de selênio metálico (Se^0) em um vidro de penicilina e em seguida adicionou-se 0,01 g do agente redutor Boridreto de Sódio (NaBH_4). Ambos os reagentes foram misturados até formarem uma massa homogênea de cor

acinzentada. Em seguida foi adicionado lentamente cerca de 1 mL de água ultrapura e manteve-se o sistema sob constante agitação e aquecimento em torno de 100 °C. O processo de redução do selênio durou cerca de 3 minutos, esse processo foi evidenciado pela característica incolor da solução contendo íons seleneto e ocorreu sob atmosfera de nitrogênio.

Ao final, injetou-se o Se^{2-} ao balão da etapa I e deixou-se a reação ocorrer por 150 minutos. O volume total da síntese observado no fim foi de 56 mL. A proporção Zn:Se:AMS foi de 1:0,0004:6.

Todos os reagentes utilizados nas sínteses foram da *Sigma-Aldrich*.

4.3 Caracterização Óptica dos *Quantum Dots*

Após as etapas descritas acima, fez-se, então, a caracterização óptica dos QDs utilizando espectroscopia de absorção e emissão das amostras descritas. Essa caracterização é importante para se avaliar a qualidade óptica dos QDs, bem como para saber em que comprimento de onda está sua fluorescência, para sua utilização na marcação dos sistemas biológicos de interesse, além da escolha dos equipamentos para análise, os quais devem conter os filtros correspondentes aos comprimentos de onda da emissão.

As medidas para caracterização óptica das nanopartículas foram realizadas utilizando os instrumentos fluorímetro Perkin-Elmer LS55, e o espectrofotômetro UVVIS SHIMADZU, utilizando a água ultrapura como referência.

4.4 Purificação e Esterilização das Nanopartículas

Para purificar as amostras de QDs foi utilizado o filtro *Pierce Protein Concentrator* de 20 K MWCO (*Thermo Scientific*). O filtro consiste em uma membrana de celulose aderida em um suporte acoplado a um tubo tipo Falcon (15 mL), que durante a centrifugação retém moléculas de peso superior a 20.000 Daltons, concentrando assim a amostra e eliminando resíduos (Fig. 13).



Fig 13: Tubos de filtração *Pierce Protein Concentrator* (adaptado de: www.thermoscientific.com)

Os filtros são primeiramente centrifugados com água ultra pura (5000 rpm, 5 min) para a eliminação do glicerol presente membrana. O glicerol é um agente umectante que evita o ressecamento da membrana. Após a remoção do glicerol, os QDs foram centrifugados e ressuspensos em tampão salino-fosfato (PBS) sucessivas vezes (2500 rpm, 5 min) até a total remoção restos de síntese (resíduos de elementos não reagentes e excesso de agentes funcionalizantes). Desta forma além de concentrar e purificar a amostra, o pH, originalmente alto após a síntese, também fica ajustado em 7,4

Seguidamente à centrifugação, as nanopartículas foram esterilizadas em membrana de 0,22 μm (Millipore) para evitar contaminação. Uma alíquota de 1 mL foi retirada para a caracterização óptica e determinação da concentração em nanopartículas por mL.

4.5 Padronização do Numero de Partículas

O cálculo da estimativa de concentração de partículas de CdTe por mL foi feito de acordo com Yu *et al*, 2003 e Dagtepe *et al*, 2007 (Yu *et al*, 2003; Dagtepe *et al*, 2007), que utilizaram o espectro de absorção para estimar o tamanho e o número de partículas presentes. De acordo com a lei de Beer-Lambert, quanto maior a absorvância, maior a concentração:

$$A = \epsilon.C.L \quad \text{Eq. 1}$$

onde: A é a absorvância na posição do primeiro máximo de absorção da amostra de QDs, ϵ é o coeficiente de extinção (L/mol/cm), C é a concentração da amostra e L é

o comprimento do trajeto da luz (valor fixo em 1 cm, correspondente à distância da cubeta de uso padrão).

Utilizando a equação de Dagtepe (Eq. 2) chegamos à estimativa dos diâmetros dos QDs, considerando o primeiro máximo de absorção (Dagtepe *et al*, 2005).

$$d = \frac{1,38435 - 0,0066x\lambda}{1 - 0,0121x\lambda} \quad \text{Eq. 2}$$

onde: d é o diâmetro da nanopartícula e λ é o comprimento de onda do primeiro máximo de absorção.

Para chegar à estimativa da concentração primeiro calculamos o valor do coeficiente de extinção utilizando a Eq. 3 (abaixo) de Yu (Yu *et al*, 2003), lembrando que ϵ é o coeficiente de extinção (L/mol/cm) e d é o tamanho ou diâmetro dos QDs.

$$\epsilon = 10043(d)^{2,12} \quad \text{Eq. 3}$$

Depois aplicamos a equação de Beer-Lambert, chegando então à estimativa da concentração.

Para os QDs de ZnSe o número de partículas foi estimado a partir da concentração inicial de reagentes utilizados na síntese das nanopartículas.

Para este cálculo foram consideradas várias aproximações, uma vez que não se tem na literatura o coeficiente de extinção molar para o ZnSe e logo não podemos calcular sua concentração pela lei de Beer-Lambert. A primeira consideração é assumir que o ZnSe está na estrutura de blenda de zinco (Fig. 14):

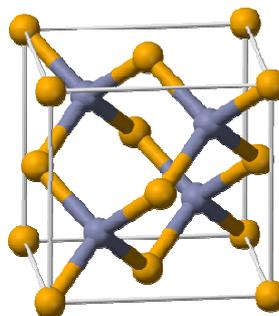


Fig. 14: Representação da estrutura blenda de zinco. Representação dos átomos de Zinco em cinza e átomos de Selênio em Laranja. (Adaptado de WWW.Wikipedia)

O ZnSe tem um parâmetro de rede (aresta do cubo) de 0,5668 nm tendo um volume de:

$$V_{\text{cubo}} = a^3 \rightarrow V_{\text{cubo}} = (0,5668 \text{ nm})^3 = 0,1821 \text{ nm}^3.$$

Considerando que todas as nanopartículas são esferas de 3 nm (raio 1,5 nm) de diâmetro tendo volume (essa estimativa foi feita com base nos resultados do grupo que indicam, através de difração de raio-X que essas partículas têm por volta de 3 nm de diâmetro):

$$V_{\text{esfera}} = (4/3)\pi r^3 \rightarrow V_{\text{esfera}} = (4/3) \pi (1,5 \text{ nm})^3 = 14,139 \text{ nm}^3.$$

Tendo-se os dois volumes, é possível calcular quantos cubos têm em uma nanopartícula:

$$\text{N}^\circ \text{ de cubos na nanopartícula} = (V_{\text{esfera}} / V_{\text{cubo}}) = 14,139 / 0,1821 = 77,6 \text{ cubos.}$$

É preciso saber quantos pares de ZnSe se tem em um cubo, para isso se calcula o fator ocupacional. A Figura 14 representa apenas um cubo, porém numa rede cristalina existem vários cubos um ao lado do outro, logo os 8 selênios das pontas estão interagindo com 8 cubos e os 6 selênios restantes estão interagindo com 2 cubos, tendo-se o seguinte cálculo para o fator ocupacional (F):

$$F = 8 (1/8) + 6 (1/2) = 4.$$

Agora é possível saber quantos pares de ZnSe existem nos 77,6 cubos que cabem na nanopartícula:

$$(77,6) \times 4 = 310,57 \text{ pares de ZnSe por nanopartícula.}$$

Na síntese realizada no laboratório o selênio é o reagente limitante. Sua massa pesada foi de 0,0010 g ($1,26 \times 10^{-5}$ mol). O volume final da síntese foi de 56 mL. Considerando que todo selênio reagiu para formar ZnSe, tem-se:

$$(1/56) \times 1,26 \times 10^{-5} = 0,0225 \times 10^{-5} \text{ mol de ZnSe por mL da síntese.}$$

Multiplicando-se pela constante de Avogadro, pode-se obter o número de pares de ZnSe formados na síntese:

$$0,0225 \times 10^{-5} \times 6,02 \times 10^{23} = 13,545 \times 10^{16} \text{ pares de ZnSe por mL da síntese.}$$

Sabendo-se que uma partícula tem 310,57 pares de ZnSe e sabendo-se que se tem $13,545 \times 10^{16}$ pares de ZnSe por mL da síntese, pode-se estimar quantas nanopartículas se tem por mL:

$$(13,545 \times 10^{16} / 310,57) \sim 4,4 \times 10^{14} \text{ nanopartículas por mL de síntese.}$$

Para que a suspensão de ZnSe se encontrasse na mesma ordem de grandeza que os demais QDs, um volume total de 50 mL de síntese foi concentrado em 10 vezes, tendo seu volume reduzido para 5 mL, utilizando-se os tubos concentradores filtro *Pierce Protein Concentrator* de 20 K MWCO (*Thermo Scientific*).

Foi calculada a concentração das suspensões, após filtradas e purificadas, e a partir desta concentração o volume foi justado com PBS estéril para que todas as suspensões de QDs permanecessem em uma ordem de grandeza de 10^{15} partículas/mL.

De cada suspensão mãe (10^{15} QDs/mL) foram retiradas alíquotas de diferentes volumes e feitas diluições no próprio meio de cultura para incubação. As concentrações finais em contato com as células foram: 10^{14} partículas/mL ($\sim 0,17 \mu\text{M}$); 5×10^{13} partículas/mL ($\sim 0,085 \mu\text{M}$); $3,5 \times 10^{13}$ partículas/mL ($\sim 0,0595 \mu\text{M}$); 10^{13} partículas/mL ($\sim 0,017 \mu\text{M}$) e 10^{12} partículas/mL ($0,0017 \mu\text{M}$).

4.6 Cultivo Celular

Para a realização dos testes de toxicidade, foi escolhida a linhagem celular imortalizada RAW 264.7 (Fig. 15). Esta é uma linhagem macrofágica aderente e imortalizada por vírus (Raschke *et al*, 1978) que preserva todas as características de uma célula fagocítica do sistema mononuclear. As células são oriundas do Banco de

Células do Rio de Janeiro - UFRJ e foram mantidas em garrafas de cultura de 25 cm², com filtro (TPP), em atmosfera de CO₂ a 5% e a 37 °C durante todo o período experimental.

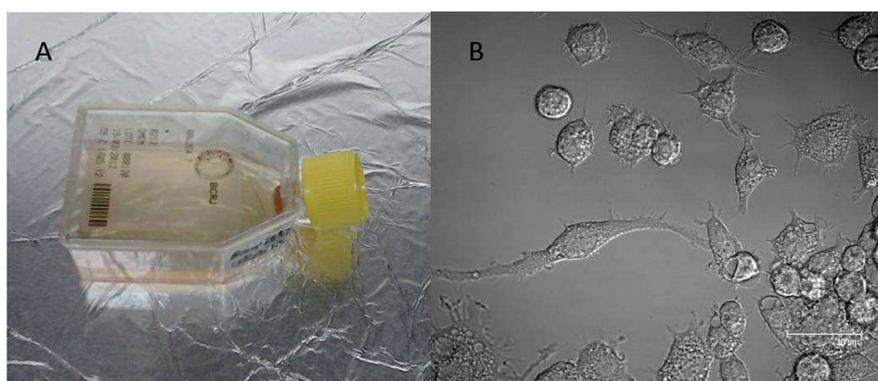


Fig. 15: aspecto de cultivo celular oriunda do Banco de Células do Rio de Janeiro (esquerda). Imagem das células em microscopia óptica (direita)

Para manutenção das células o meio de cultura utilizado foi *Dulbecco Medium Eagle Modified* (DMEM) (*Invitrogen*), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (*Invitrogen*) e 1% de antibiótico-antimicótico (penicilina/estreptomicina, *Invitrogen*), de acordo com instruções do Banco de Células do Rio de Janeiro, trocado a cada três dias. A troca de meio de cultura oferece novos nutrientes e um pH ideal para que as células permaneçam saudáveis.

Para a manutenção da confluência celular, as células foram tripsinizadas a cada semana. Durante a descolagem das células, todo o meio de cultura é removido e as células são lavadas com PBS, 1x e pH 7.4, com a finalidade de remover todos os vestígios de SFB, agente inativante da tripsina. São adicionados de 3 a 5 mL de Tripsina + EDTA 0,05% (*Invitrogen*) por garrafa, que posteriormente são encaminhadas para a estufa, onde ficam em incubação por 8 a 10 min, em temperatura ideal para ação da enzima (37 °C). Após este tempo, as células são descoladas sob agitação e homogeneização, e transferidas para tubo de centrifugação, tipo *Falcon*, contendo 5 mL de meio DMEM, pois o SFB presente neste é necessário para a inativação da enzima, evitando danos às células. Os tubos são centrifugados (*Eppendorf* refrigerada) a 24 °C, 1200 rpm, por 10 minutos

para formação de *pellet* de células. O sobrenadante é descartado e o *pellet* é ressuspenso em 1 mL de meio DMEM. Uma alíquota de 10 μ L é retirada e homogeneizada em 90 μ L de Azul de Tripán, para avaliação. Após a contagem, a concentração de células é ajustada para 10^6 células/mL de meio, plaqueadas em garrafa de cultura ou placas de 06 poços e mantidas para condução de procedimentos experimentais.

4.7 Incubação com Nanopartículas

Para a realização dos testes MTT, Viabilidade e Ciclo Celular por PI, 10^6 cels/mL foram semeadas em placas de 06 poços e encubadas por 2 horas em estufa para adesão das células e estabilização de seu metabolismo. Após este período, todo o sobrenadante foi descartado e prosseguiu-se a lavagem com PBS 1x e então foi adicionado novo meio de cultura: DMEM sem vermelho de Fenol (indicador de pH presente, que interfere com as propriedades ópticas dos QDs) suplementado apenas com 3% SFB (pois interfere na estabilidade dos QDs) e antibiótico. Foram então adicionadas 5 alíquotas em diferentes volumes de cada tipo de QDs afim de se obter em cada poço as concentrações finais desejadas.



Fig. 16: Células plaqueadas em placas de 06 poços (esquerda). Garrafas de Cultura e placas de 06 poços durante incubação em estufa de CO₂ (direita).

Após a adição das nanopartículas (Fig. 17), as placas foram mantidas em estufa, onde por um período de 24 horas. Ao término deste período, foram realizados os testes que se seguem.

Os poços com controles negativos e positivos foram testados concomitantemente com as amostras experimentais e ambos não receberam o tratamento com as nanopartículas. O controle negativo era composto por amostras de células que não receberam nenhum tipo de estímulo, apenas meio de cultura, e por isso suas medidas foram utilizadas com padrão de viabilidade 100%.



Fig. 17: Amostras de QDs concentradas e estéreis prontas para uso.

4.8 MTT

A solução de MTT foi preparada dissolvendo-se 5 mg de MTT comercial (*Sigma-Aldrich*) em 1 mL de PBS 1x, pH 7,4. Após as 24 horas de incubação das células com as nanopartículas nas diferentes concentrações (7,6 nM - 760 nM), o sobrenadante foi aliquotado e as células foram lavadas com PBS, e então foram adicionados 550 μ L de PBS e 55 μ L da solução de MTT. As placas retornaram à estufa onde ficaram mantidas por mais 2 horas.

A partir deste ponto foi preciso proteger as amostras da luz, pois os cristais de formazan são fotossensíveis e degradam-se na presença de luminosidade. Foram adicionados 400 μ L de DMSO em cada poço e com o auxílio de um *screaper*, raspase a monocamada celular aderida ao fundo da placa e o sobrenadante é armazenado para a leitura, ao abrigo da luz.

Cada alíquota é lida em espectrofotômetro (Evolution 600 da Thermo Scientific sempre utilizando a água ultra-pura como referência), em comprimento de onda de 570 nm. Quanto maior a absorbância, mais células viáveis presentes na amostra. Os

resultados são expressos em percentuais de viabilidade celular em relação à média do grupo controle, que é estabelecida como 100% de viabilidade.

4.9 Integridade de Membrana Plasmática e Análise de Ciclo Celular

A análise por citometria de fluxo foi feita em citômetro BD FACSCalibur, e as aquisições foram feitas em filtro FL2 (585/40 nm) sendo analisados de 10.000 eventos em cada experimento.

Após a incubação de 24 horas dos grupos experimentais e controles negativos (de acordo com os padrões mencionados), o sobrenadante foi removido e aliquoteado e as células lavadas e tripsinizadas segundo protocolo já citado (Fig.18). O *pellet* de células foi ressuspensionado em 1 mL de solução de albumina 2% (49 mL de PBS estéril + 1 g de albumina – *Sigma-Aldrich*), onde permaneceu por um período de 30 minutos. As células então foram marcadas com Iodeto de Propídeo (IP) - na concentração de 2 μ L/mL de albumina e analisadas no equipamento anteriormente mencionado.

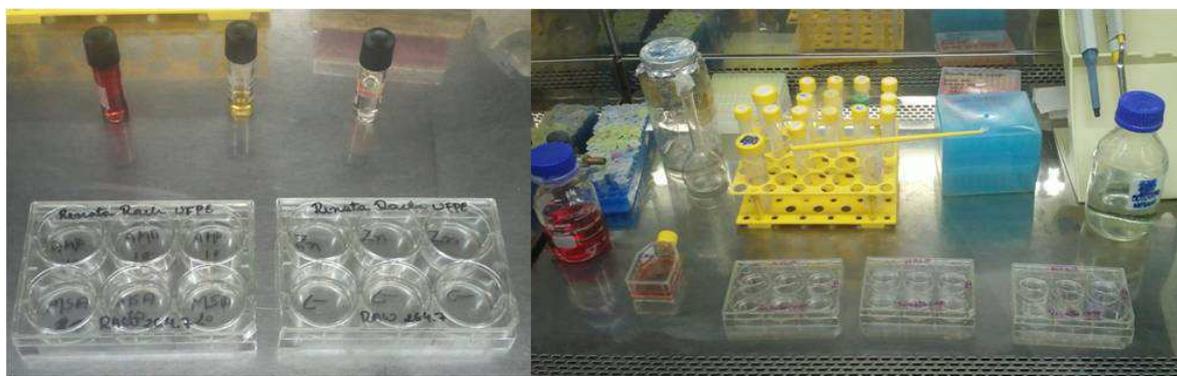


Fig. 18: Plaqueamento das células para citometria de fluxo.

Para análise de ciclo celular, após a incubação por 30 minutos com albumina, as células foram centrifugadas (1200 rpm, 10 min), o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensionado em solução detergente (PSSI: 1,4uL de Triton X-100 1%; 20 uL de RNase (20mg); 60 uL de Iodeto de Propídeo 2mg/mL; PBS qsp - 10 mL), onde permaneceram por mais 30 minutos e em seguida foram encaminhadas para análise por Citometria de Fluxo.

4.10 Análise de Cálcio

Para a análise de cálcio, após a tripsinização, as células foram semeadas em placa de 24 poços em uma densidade de 10^4 células por poço, diferentemente dos testes anteriores onde foi utilizada placa de 06 poços em concentração de 10^6 cels/mL, e incubadas por 2 horas para adesão. Então todos os poços foram lavados com PBS 1x e é adicionado 1 mL de meio de cultura DMEM sem Vermelho de Fenol (*Invitrogen*) e 3% de SFB, juntamente com as nanopartículas, e incubadas. 1 hora depois 800 μ L do sobrenadante são retirados e adicionados 2 μ L do fluoróforo Fluo-3. Assim as células retornam à estufa, onde permanecem por mais 1 hora.

Após as 2 horas de incubação (1 hora sem fluoróforo e 1 hora com o Fluo-3) as células foram lavadas várias vezes com tampão de lavagem para a remoção completa do sobrenadante (onde estavam presentes além das nanopartículas não internalizadas, o cálcio não ligado e metabólitos celulares) e encaminhadas para o microscópio de fluorescência invertido *Axio Observer A1* (Zeiss), acoplado à câmera CCD *Axio Cam* (Zeiss) para a aquisição de imagens em objetiva de 32x. Após a aquisição das imagens, os dados foram processados pelo Software *AxioVision* (Zeiss, Alemanha), que analisou as intensidades de fluorescência, após ligação do Fluo-3 com o Ca^{2+} liberado no citoplasma, e as comparou ao grupo controle. Os resultados foram adicionados em planilha para confecção de gráfico.

4.11 Análise por Microscopia de fluorescência e Confocal à Laser

Para a aquisição de imagens as células foi adicionado meio de cultura (DMEM sem vermelho de Fenol), para que não houvesse interferência na fluorescência das nanopartículas. Cada um dos três tipos de nanopartículas foi adicionado em um poço diferente, em volume adequado para se obter a concentração celular final desejada. Foram produzidos poços de cada *QD* com a maior concentração utilizada nos testes: 10^{14} *QDs*/mL e as células foram encaminhadas novamente para incubação por um período de 24 horas (Fig. 19).

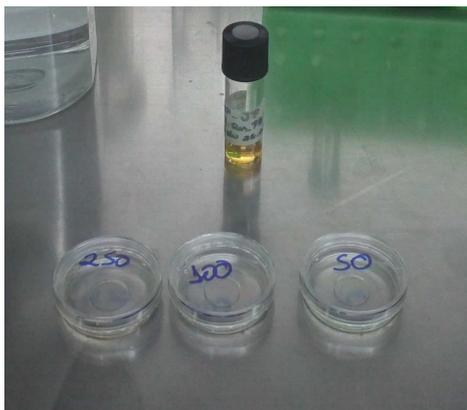


Fig. 19: Placas para microscopia com 10^6 células aderidas e estimulas por QDs,

Ao término da incubação, o sobrenadante foi removido, as células foram lavadas com PBS e encaminhadas para microscópio de fluorescência (LEICA DMI 4000 B) e observadas com uma objetiva de 60x (NA = 1,25). As imagens foram capturadas por câmera e processadas pelo Software em aumento 60x.

Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos em ambiente asséptico, em capela de fluxo laminar nível 2, utilizando os equipamentos de proteção individuais necessários. Os materiais utilizados nos procedimentos foram todos esterilizados por calor úmido, em autoclave, a 121°C , durante 20 minutos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização óptica dos *Quantum Dots*

A obtenção dos espectros, tanto de absorção como de emissão, é importante, pois nos informa características como a homogeneidade das populações de nanopartículas envolvidas no processo de fluorescência, além do tamanho e concentração das mesmas. É importante também com relação à análise da fluorescência nos equipamentos. Quanto mais larga é a primeira banda de absorção maior a distribuição de tamanho das nanopartículas. Quanto mais largo é o espectro de emissão, mais defeitos existem nos cristais. Quanto mais deslocado para a direita for a primeira banda de absorção, maior o tamanho do *QD* e mais para o vermelho será sua emissão.

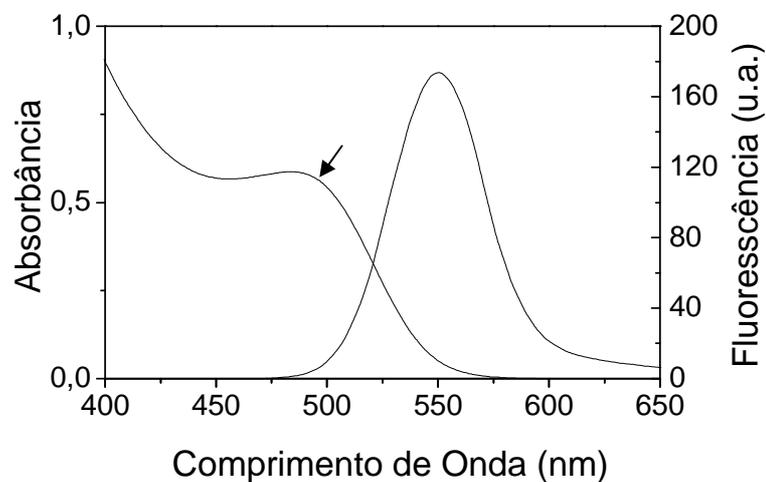


Fig. 20: Caracterização óptica dos *Quantum Dots* de CdTe/CdS-AMP mostrando o primeiro pico de absorbância (seta) em 491 nm e um pico de emissão em 550 nm. Excitação em 365 nm.

Na Figura 20 podemos ver o gráfico de caracterização óptica das nanopartículas de CdTe/CdS-AMP que apresentaram um pico de absorção em 491 nm e emitem fluorescência em 550 nm, na região do espectro eletromagnético do verde. Estas nanopartículas apresentaram um diâmetro médio de 2,6 nm segundo a equação Dagtepe (Dagtepe *et al*, 2007). A concentração da suspensão das

nanopartículas de CdTe/CdS-AMP pôde ser estimada (Yu *et al*, 2003) como sendo aproximadamente $4,5 \times 10^{15}$ partículas/mL que corresponde a $7,6 \mu\text{M}$, dado obtido a partir da equação de Beer-Lambert e Yu *et al*. A largura à meia altura (FWHM, do inglês *full width at half maximum*) foi estimada em 50 nm, mostrando que os cristais apresentam poucos defeitos.

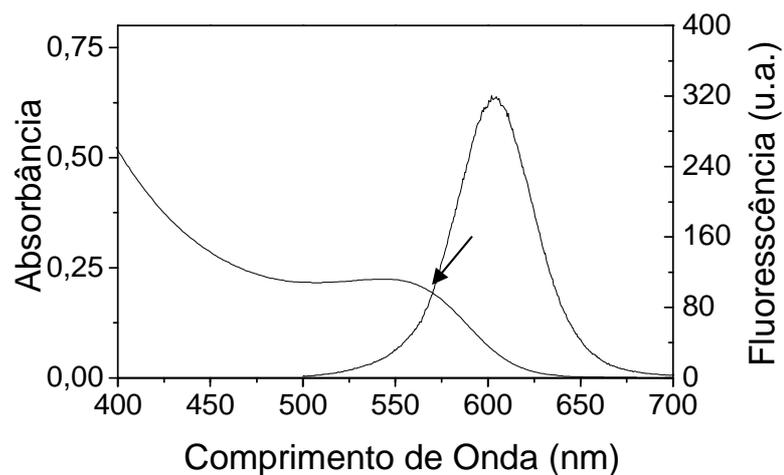


Fig. 21: Caracterização óptica de CdTe/CdS-AMS mostrando o primeiro pico de absorbância (seta) em 555 nm e um pico de emissão em 600 nm. Excitação em 365 nm.

Na Figura 21 temos o gráfico de caracterização óptica de nanopartículas de CdTe/CdS-AMS. O pico de absorção é em 555 nm e emitem fluorescência em 600 nm, na região laranja do espectro eletromagnético. Semelhantemente ao AMP, estas partículas apresentaram um diâmetro médio de 3,1 nm, concentração aproximada também de $4,5 \times 10^{15}$ partículas/ mL ($7,6 \mu\text{M}$) e FWHM = 49 nm.

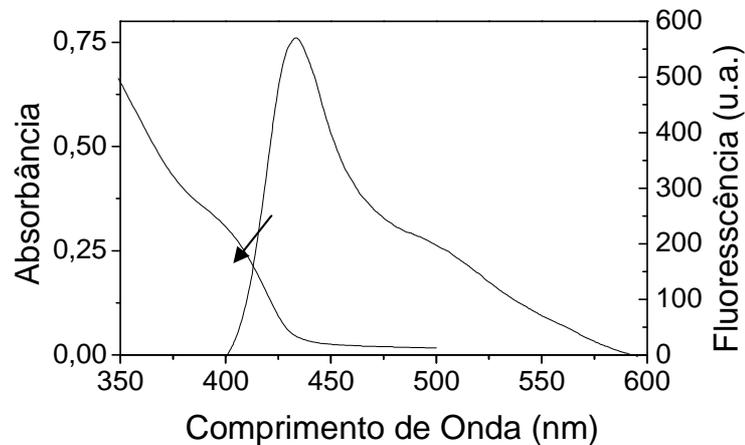


Fig. 22: Caracterização óptica de ZnSe/ZnS-AMS mostrando o primeiro pico de absorvância (seta) em 400 nm e um pico de emissão em 440 nm. Excitação em 315 nm.

Na Figura 22 temos o mesmo gráfico de caracterização óptica, porém das nanopartículas de ZnSe/ZnS-AMS. Elas apresentaram um pico de absorção em 400 nm e emitem fluorescência em 440 nm (excitação em 315 nm), na região do azul do espectro eletromagnético. A banda larga de fluorescência (até a região do laranja, apesar da fraca Fluorescência), indica que esses cristais ainda apresentam defeitos de superfície.

Por não conterem um núcleo composto de CdTe, a sua concentração não pode ser estimada pela equação Dagtepe e foi estimada então com base nas concentrações de reagentes utilizados durante a síntese e considerando que todos reagiram 100%. Com este protocolo, a ordem de grandeza do número de partículas contidas na síntese foi de aproximadamente $4,5 \cdot 10^{15}$ partículas/mL (7,6 μ M).

5.2 MTT

O teste do MTT mostrou a porcentagem de células viáveis após 24 horas de exposição à cada um dos QDs nas 5 concentrações diferentes.

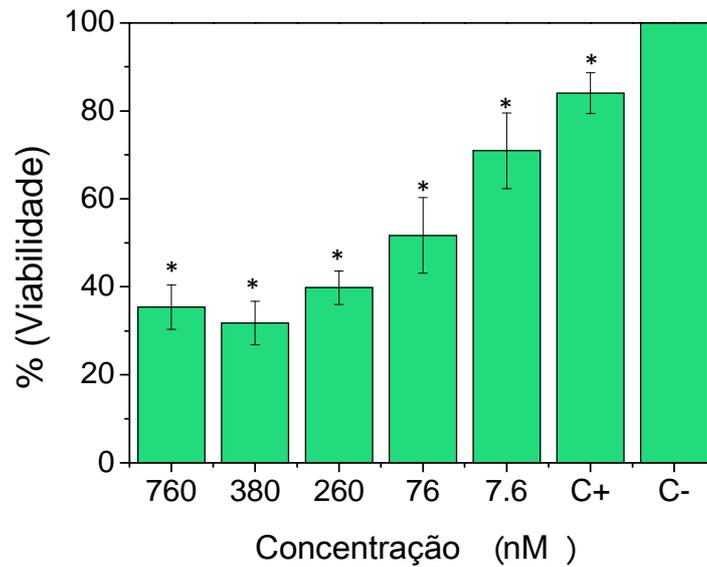


Fig.23: Gráfico de viabilidade celular após 24 horas de exposição aos QDs de CdTe/CdS-AMP

A Figura 23 mostra o gráfico de viabilidade de células RAW 264.7 após 24 horas de exposição aos QDs de CdTe/CdS-AMP. De acordo com o Teste One-Way ANOVA houve redução significativa na viabilidade para todas as concentrações e C+ em relação ao controle negativo. Segundo o gráfico, a IC_{50} pôde ser estimada em uma concentração de 76 nM de QDs, o que corresponde a 10^{13} partículas/mL.

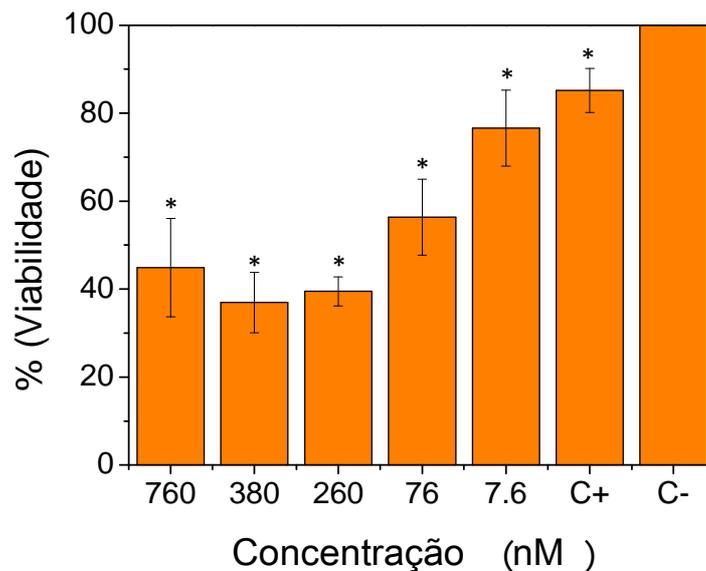


Fig. 24: Gráfico de Viabilidade celular após 24 horas de exposição aos QDs de CdTe/CdS-AMS.

No teste de viabilidade MTT após a exposição com *QDs* CdTe/CdS-AMS de nota-se o mesmo padrão de viabilidade visto para os *QDs* de AMP. Também de acordo com o Teste One-Way ANOVA houve redução significativa na viabilidade para todas as concentrações e C+ em relação ao controle negativo, o que sugere que não há diferença entre o uso de AMP ou AMS como agentes funcionalizantes. Segundo o gráfico, a IC_{50} também pôde ser estimada em 76 nM (10^{13} partículas/mL)

Em 2003, Lopez e colaboradores (Lopes *et al*, 2003) mostraram os efeitos provocados pelo Cádmiu sobre culturas celulares Neurônios. Os autores concluíram que em concentrações baixas ($< 1 \mu\text{M}$), o Cádmiu é capaz de provocar apoptose, e em concentrações elevadas ($> 1 \mu\text{M}$) provoca necrose das células, mostrando seu alto poder de agressão. Em 2004, Derfus *et al.* mostrou que nanopartículas de CdTe liberam espontaneamente no meio íons Cd^{2+} e que estes íons são os maiores responsáveis pela toxicidade destas nanopartículas (Derkus *et al*, 2004).

Em 2011, Jiahan Li e colaboradores (Li *et al*, 2011) mostraram que a toxicidade de *QDs* de CdTe está relacionada com seu efeito sobre a mitocôndria. Eles mostraram que os *QDs* aumentam a permeabilidade da membrana mitocondrial interna aos íons H^+ e K^+ , provocando uma transição de permeabilidade e inibindo a respiração. Esta transição de permeabilidade ocasiona a liberação de proteínas nocivas como citocromo C no citoplasma, que ativam mecanismos apoptóticos, além de provocar estresse oxidativo e colapso do potencial de membrana mitocondrial.

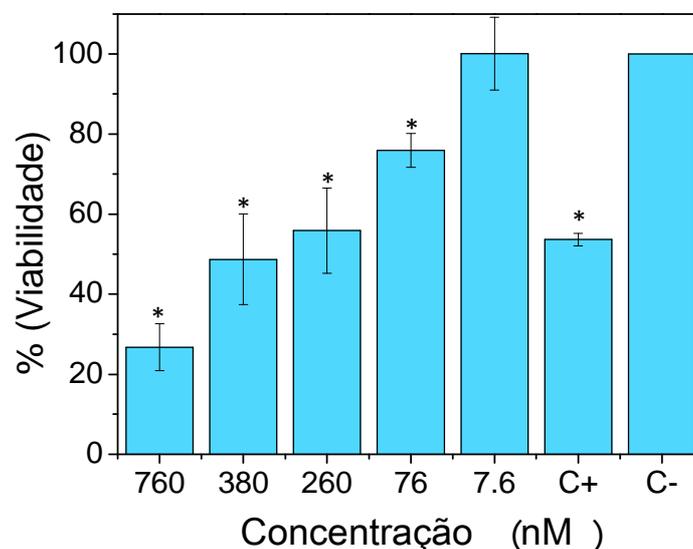


Fig. 25: Gráfico de Viabilidade celular após 24 horas de exposição aos *QDs* de ZnSe/ZnS-AMS.

Já a Figura 25, que mostra o gráfico de viabilidade das células nas mesmas condições após exposição aos *QDs* de ZnSe/ZnS-AMS, apresentou um padrão de viabilidade diferente daqueles vistos anteriormente. Houve diferença significativa para todas as concentrações da nanopartícula, exceto para a menor delas, 1 μL , que corresponde a aproximadamente 7,6 nM (10^{12} partículas/mL), de acordo com o teste estatístico. Além disto, a IC_{50} foi diferente daquela mostrada anteriormente, situando-se entre 260 e 380 nM ($0,35$ e $0,5 \times 10^{14}$ *QDs*/mL).

Este aumento na viabilidade corrobora com dados da literatura onde sabe-se que *QDs* sintetizados com núcleo e casca de Cádmio liberam íons Cd^{2+} no meio onde se encontram (Derfus *et al*, 2004). Assim sendo, *QDs* sintetizados com Zinco no lugar de Cádmio se mostram como uma alternativa para aplicações em biologia.

Segundo Fang e colaboradores em 2000, altas concentrações citoplasmáticas de Zinco provocam a translocação de citocromo C da mitocôndria para o citosol, e consequente ativação de caspases que iniciam o processo de apoptose (Feng *et al*, 2000). Em 1995 Link e Von Jagow mostraram que concentrações de Zinco entre 100 e 200 nM inibem a cadeia transportadora de elétrons (Link and Jagow, 1995) Estudos de Dineley em 2001 mostraram que concentrações acima de 30 μM inibem a respiração celular e acima de 200 nM o Zinco promove o dobro de acúmulo de ROS na mitocôndria (Dineley *et al*, 2003). O que se observa nestes estudos realizados em diversos sistemas biológicos *in vitro*, como células malignas da próstata (Feng *et al*, 2000) células de coração bovino (Link and Jagow, 1995) e neurônios (Dineley *et al*, 2003; sobiologia.com.br, 2013), é que as concentrações necessárias para provocar disfunções celulares são mais altas que aquelas necessárias para o Cádmio.

Além disto, estes estudos corroboram com os resultados aqui encontrados em relação ao Zinco, onde apenas concentrações \geq que 100 nM molar provocaram redução maior que 50% na viabilidade celular.

Tanto o Zinco como o Selênio são elementos que estão presentes naturalmente na biologia de organismos e provém da nossa alimentação. A Castanha-Do-Pará, semente conhecida nacional e internacionalmente, é um alimento rico em Selênio e deve ser consumida com moderação. Zinco e Selênio participam como Co-Fatores enzimáticos de vários processos biológicos, e por isso

são tolerados e são necessários ao organismo. Porém, estes elementos devem ser ingeridos com parcimônia, uma vez que altas concentrações podem causar intoxicação.

Como mostrado na Figura 22, os QDs de ZnSe/ZnS-AMS, apesar de ainda provocarem dano e morte celular, se mostraram menos tóxicos, e em baixa concentração não apresentou diferença significativa em relação ao controle. Por outro lado, os QDs de ZnSe têm a desvantagem de precisarem ter sua fluorescência excitada no UV, o que além de poder ser prejudicial para as células, têm um baixo poder de penetração nos tecidos biológicos dificultando sua aplicação *in vivo* (apesar de sua menor toxicidade).

5.3 Análise de Membrana

Os testes de viabilidade utilizando a metodologia de marcação de células inviáveis por Iodeto de Propídeo mostraram que após incubação de 24 horas com os três QDs na concentração final de 10^{13} QDs/mL (~76 nM) não há dano à membrana plasmática (Fig. 26). Todos QDs foram previamente testados à parte de seus reagentes para eliminar/conferir interferência de sua fluorescência nesses testes.

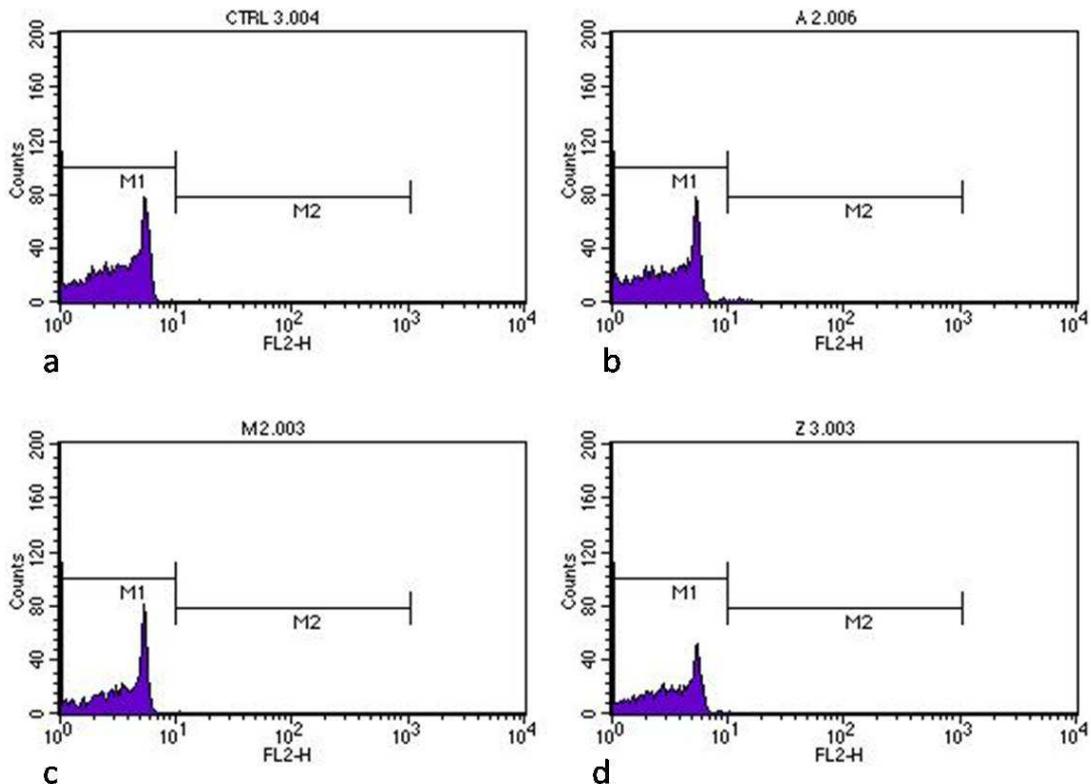


Fig. 26: Gráficos de citometria de fluxo mostrando a intensidade de fluorescência de células marcadas e não marcadas pelo PI. Atenção especial para a ausência de fluorescência em M2 para todos os grupos: (a) controle negativo; (b) células expostas à 10^{13} QDs de AMP/ mL (76 nM) por 24 horas; (c) células expostas à 10^{13} QDs de AMS/ mL (76 nM) por 24 horas; (d) células expostas à 10^{13} QDs de ZnSe/ mL (76 nM) por 24 horas.

Estes resultados são interessantes, pois de acordo com o teste de viabilidade por atividade enzimática mitocondrial esta mesma concentração reduziu em 50% o número de células viáveis nas incubações com nanopartículas de CdTe/ZnS-AMP e CdTe/ZnS-AMS. Podemos entender, apesar de não haver danos aparentes à membrana plasmática nesta concentração (76 nM), já há o comprometimento da mitocôndria, responsável pela respiração celular, crucial para que a célula mantenha seu funcionamento.

Lórvic em 2005 mostrou que QDs de CdTe funcionalizados com AMP provocam queda na viabilidade após apenas 4 horas de exposição a uma concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ pelo teste de MTT em células de câncer de mama humanas (MCF-7). Lórvic concluiu que a mitocôndria é uma das organelas mais sensíveis à presença de QDs e é a primeira a ser afetada por eles. Danos à membrana plasmática também foram observados nas mesmas condições, porém apenas após 24 horas de incubação, o que supôs-se pelos autores ser reflexo da ativação de mecanismos apoptóticos após o comprometimento mitocondrial (Lovric *et al*, 2055).

Além do teste de viabilidade com PI na concentração de 76 nM feita para todas as nanopartículas, foram testadas mais três concentrações de CdTeCdS-AMP (760, 380 e 260 nM) no mesmo período de tempo (resultados não apresentados). Houve diferença significativa na integridade da membrana plasmática para as concentrações 760 nM ($30,4 \pm 2,05\%$) e 380 nM ($67,2 \pm 4,0\%$).

Como perspectivas, seria interessante estudar a viabilidade celular por PI de diferentes concentrações para as nanopartículas de CdTe/ZnS-AMS e ZnSe/ZnS-AMS, e também por tempos mais prolongados com o objetivo de se observar em que momento este comprometimento da atividade mitocondrial é refletido na integridade da membrana plasmática. Espera-se que os dados obtidos com QDs de CdTe/ZnS-AMS sejam semelhantes aos de CdTe/ZnS-AMP, uma vez que ambos possuem Cádmio em sua composição. Porém estima-se que para QDs de

ZnSe/ZnS-AMS estes danos sejam menores devido ao seu caráter menos tóxico e a necessidade de concentrações mais altas para que haja disfunção celular, uma vez que tanto o zinco como o selênio são elementos que estão presentes naturalmente no metabolismo celular, como co-fatores enzimáticos.

5.4 Análise de Ciclo Celular por PI

A Figura 27 nos mostra a porcentagem de células da população em cada fase do ciclo celular após 24 horas de incubação com 10^{13} QDs/mL (76 nM). Todos QDs foram previamente testados à parte de seus reagentes para eliminar/conferir interferência de sua fluorescência nesse teste.

De acordo com o gráfico da Fig. 27, um número menor de células avança no ciclo celular após incubação com CdTe. Para essas incubações (tanto AMP quanto AMS) há uma quantidade significativamente maior de debris, e menos células entram em S e em G2 segundo teste o estatístico One-Way ANOVA. A formação de debris pode estar associada a células apoptóticas, onde a membrana plasmática divide o conteúdo citoplasmático em vesículas para que eles sejam recolhidos por células efectoras durante a promoção de reparo. Já para células incubadas com nanopartículas de ZnSe/ZnS-AMS observou-se que estes provocaram menos modificações no curso do Ciclo Celular. A formação de debris não teve significância em relação ao controle e observamos que um número de células próximo ao controle inicia a fase de duplicação de DNA (S), porém poucas delas atingem a fase G2/M (Fig. 28 a e d).

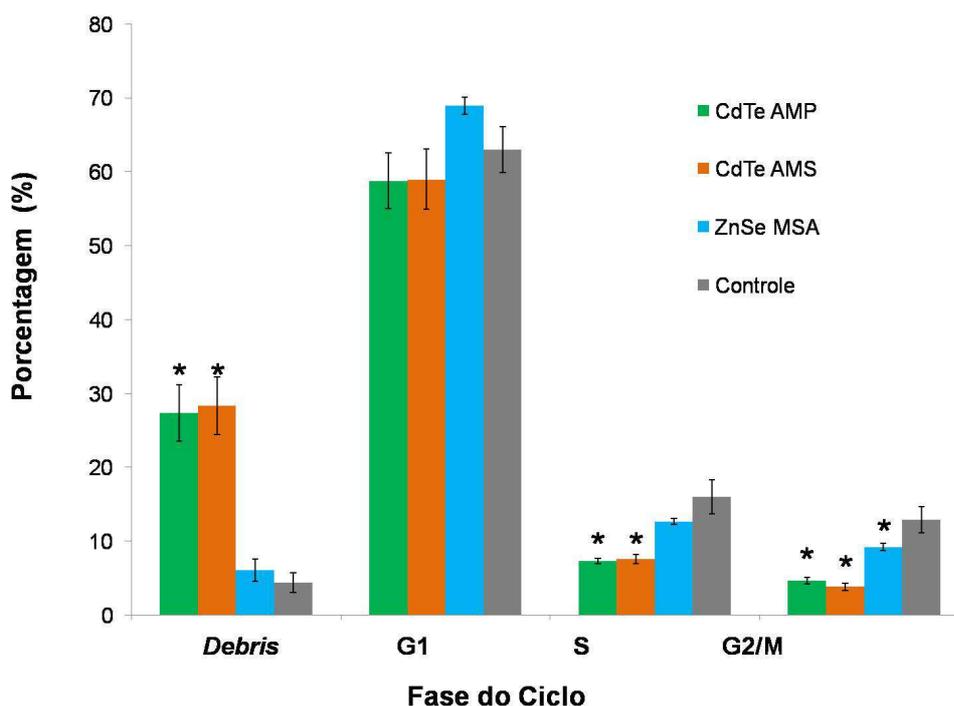


Fig. 27: Efeito dos QDs sobre o ciclo celular

Chang e colaboradores mostraram em 2011 que quanto menor é a nanopartícula, mais toxicidade ela apresenta. Os autores demonstraram que partículas menores de CdTe (<2 nm) atingem mais rapidamente o núcleo e provocam danos ao DNA com mais facilidade. Porém, em seus experimentos os tempos de incubação utilizados foram pequenos (de 0,2 horas a 3 horas). De acordo com os resultados aqui obtidos, o tamanho da nanopartícula teve pouca influência na toxicidade a nível nuclear, visto que não houve diferença significativa entre os danos ao DNA causados por nanopartículas maiores (CdTe/CdS-AMS) ou menores (CdTe/CdS-AMP), em incubações por tempos prolongados (24 horas). Neste trabalho é importante ressaltar que os QDs de ZnSe/ZnS também são funcionalizados com AMS, e mesmo assim mostram toxicidade menor. Isto indica que o componente Cádmio parece ser responsável pelos danos, ocultando os efeitos tóxicos oriundos de tamanho ou funcionalização dos QDs.

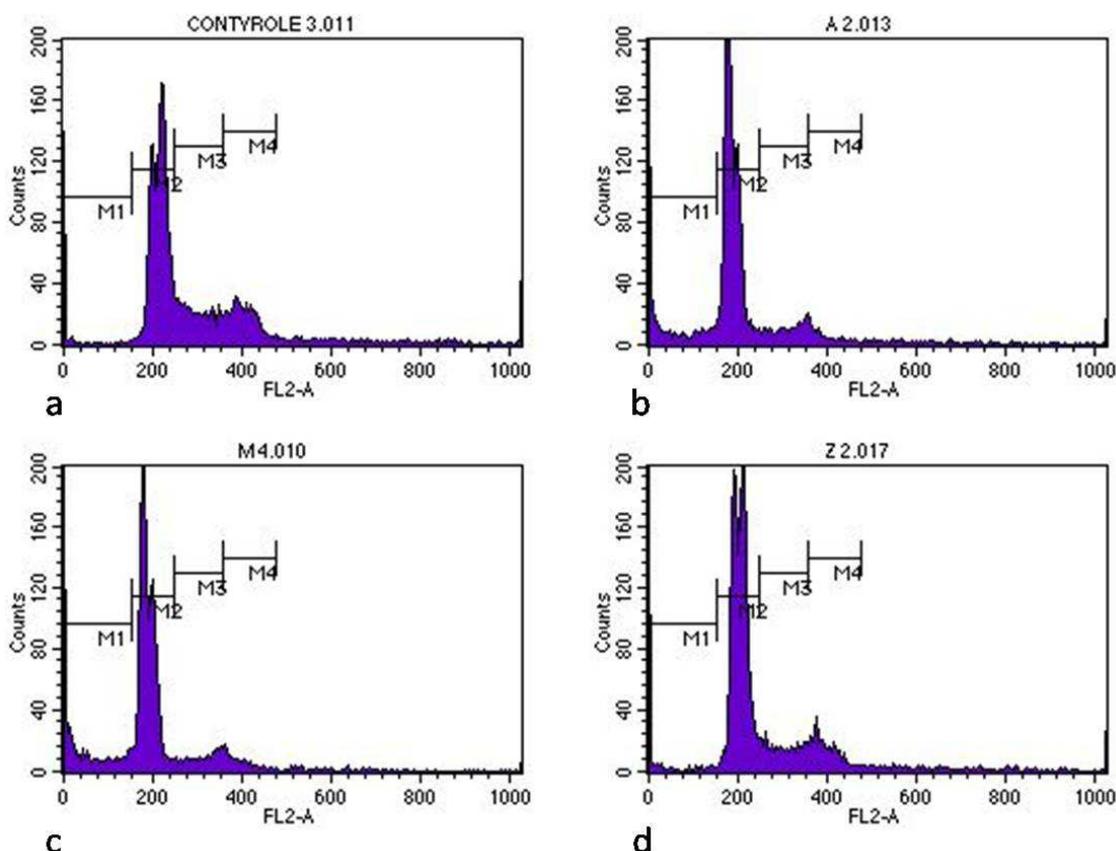


Fig 28: Gráfico de citometria mostrando os picos de fluorescência em cada fase do ciclo celular. (a) Controle, (b) CdTe-AMP, (c) CdTe-AMS e (d) ZnSe. Onde M1, M2, M3 e M4 se referem a: debris, G1, S e G2/M respectivamente.

Em 2008, Choi *et al.* mostraram que *QDs* de CdTe induzem a uma hipacetilação global do DNA, levando a uma resposta epigenética da célula. Já é de conhecimento na literatura que células apoptóticas possuem histonas hipacetiladas. Segundo os autores, exposições a *QDs* ativam mecanismos pró-apoptóticos, e inibem genes anti-apoptóticos, promovendo a morte celular programada [82].

Em comparação com o presente estudo, podemos dizer que as partículas de ZnSe/ZnS-AMS mostram um comportamento menos tóxico em relação aos *QDs* CdTe/CdS ao promoverem menos fragmentação do DNA e modificarem menos o decorrer do ciclo celular. Porém ainda há certa toxicidade apresentada, visto que estas partículas impediram a progressão das células para a fase G2/M do ciclo, bloqueando a conclusão da divisão celular.

5.5 Análise de Cálcio

A análise de liberação de Cálcio citoplasmático foi feita em células expostas às 5 concentrações diferentes de todos os QDs por um período de 2 horas e as aquisições foram feitas em excitação com filtro na faixa de 488 nm e aquisição em 510 nm.

Os resultados com CdTe-AMP (Figs 29 e 30) mostraram um aumento do Ca^{2+} citoplasmático, seja por entrada de Cálcio na célula ou esvaziamento das reservas intracelulares é progressivo à medida que as concentrações das nanopartículas aumentam.

Devido ao fato de o fluoróforo Fluo-3 apresentar pico de fluorescência em 526 nm, faixa bem próxima à emissão dos QDs de CdTe/CdS-AMP (550 nm), as leituras observadas nas maiores concentrações podem ter sido influenciadas pela fluorescência das nanopartículas. Portanto, é mais prudente se analisar apenas as concentrações ≤ 260 nM, onde se sabe, através de imagens de microscopia de fluorescência, não haver mais interferência devido à fluorescência dos QDs.

Se levarmos em conta as conclusões de Lórvic, podemos entender que as altas concentrações de cálcio no citoplasma celular são resultado de eventos precoces desencadeados pelos QDs principalmente na mitocôndria e que serão identificados mais tardiamente em várias outras localidades como membrana plasmática (ver resultados de viabilidade por PI) e DNA (Fig. 26).

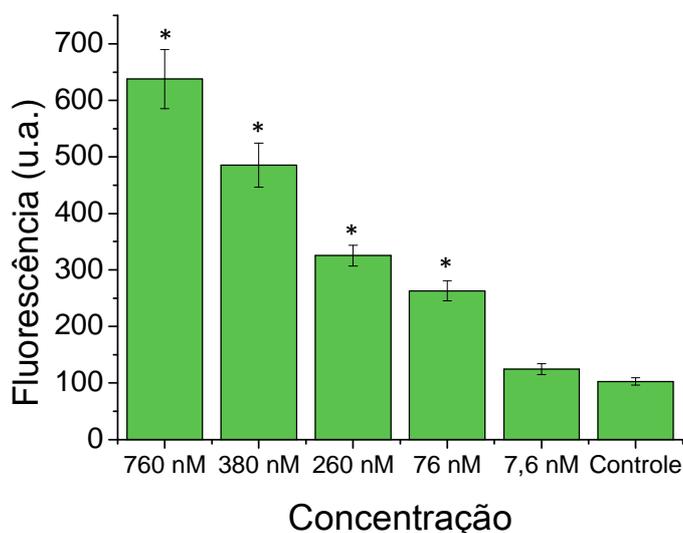


Fig. 29: Gráfico mostrando a intensidade de fluorescência emitida devido à ligação do Fluo-3 com o Ca^{2+} liberado, após 2 horas de exposição por diferentes concentrações de QDs de CdTe-AMP.

A Figura 30 mostra imagens das células marcadas com o fluoróforo Fluo-3 após 2 horas de incubação. Observe que a fluorescência aumenta sua intensidade de forma dose dependente, inclusive nas menores concentrações, onde não há interferência das nanopartículas.

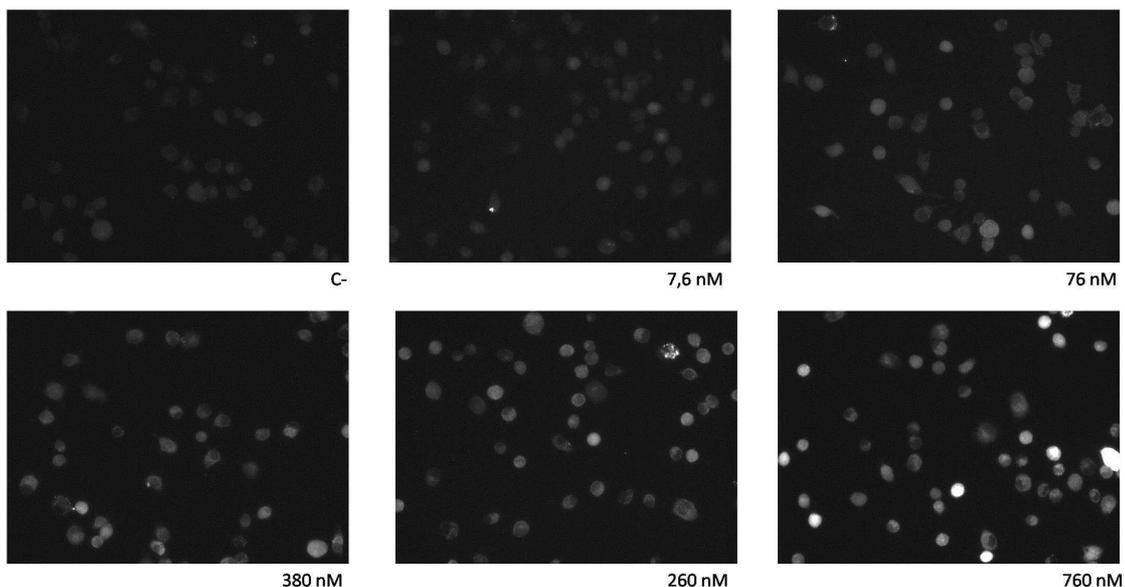


Fig. 30: Variação da intensidade de fluorescência de acordo com a concentração de QDs de CdTe-AMP.

A Figura 31 mostra a proporção de íons Ca^{2+} presente no citoplasma celular após um período de exposição de 2 horas aos QDs de CdTe-AMS. Observou-se que as maiores intensidades de fluorescência aqui ainda são menores que aquelas produzidas pela exposição aos QDs de CdTe-AMP, o que mostra que não ocorre o fenômeno de interferência para QDs de CdTe/CdS-AMS. Não há diferença significativa entre o controle e a menor concentração utilizada, mas há entre todas as demais.

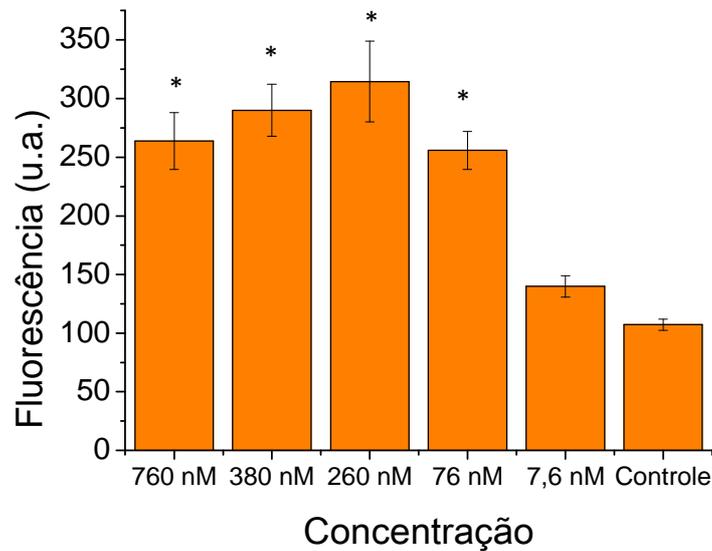


Figura 31: Gráfico da liberação de cálcio citoplasmático após 2 horas de exposição aos QDs de CdTe- AMS.

Os resultados da variação de Cálcio citoplasmático aqui apresentados discordam dos dados apresentados por Tang e colaboradores em 2008. Tang utilizou um sistema de perfusão para testar o efeito imediato da administração de três concentrações diferentes (1, 10 e 20 nM) de QDs de CdSe Hidrofóbicos. Os resultados por ele observados mostraram que para uma concentração de 1 nM de QDs não há modificação significativa nos níveis de cálcio. Porém, a administração de 10 e 20 nM provocou um aumento imediato da fluorescência média em $0,33 \pm 0,01$ e $0,47 \pm 0,02$ respectivamente.

Neste trabalho observamos que após uma exposição de 2 horas às nanopartículas de CdTe/CdS (tanto AMP como AMS) em uma concentração de ~7,6 nM (a mais próxima dos valores utilizados Tang) não há diferença significativa em comparação com o controle, segundo o Teste One-Way ANOVA. Esta diferença pode ter sua origem nos agentes químicos utilizados na síntese das nanopartículas que segundo os autores estavam em clorofórmio. De acordo com os autores, não foi utilizado nenhum tratamento nos QDs após a síntese, assim, restos de síntese como excessos de estabilizantes e elementos que não reagiram completamente (ex. Cd^{2+}) podem aumentar a toxicidade dos QDs.

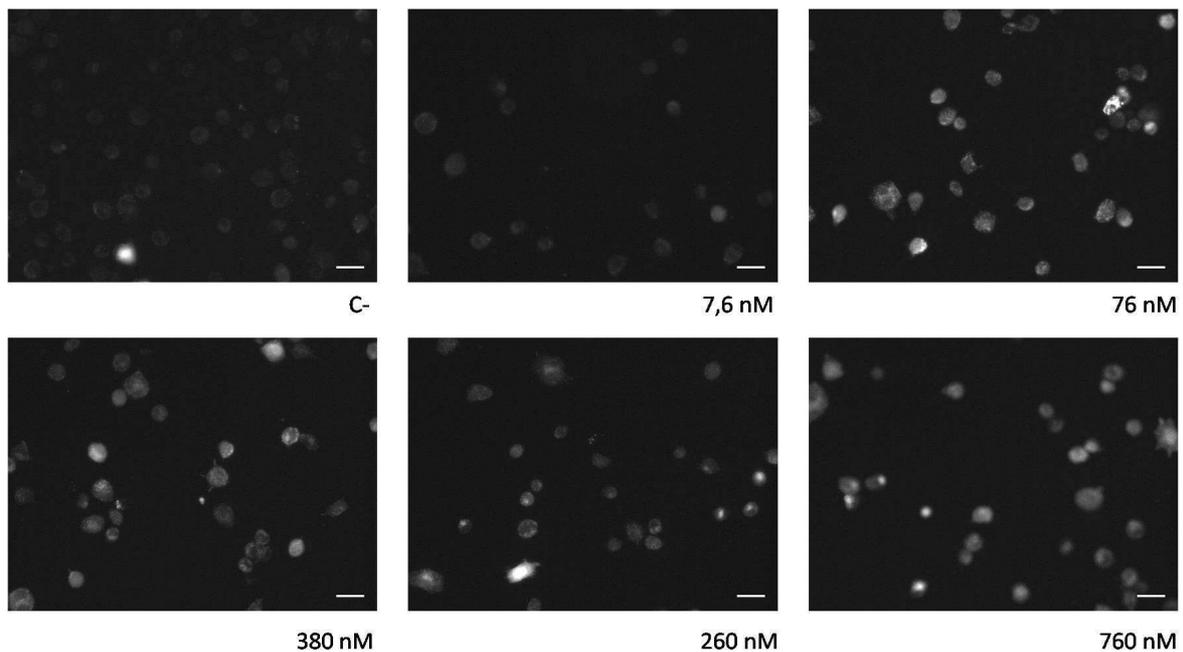


Figura 32: Imagens de células marcadas com Fluo3 e expostas aos QDs de CdTe/CdS-AMS.

Observou-se que nas incubações com partículas de CdTe/CdS-AMS a fluorescência adquirida atinge seu pico na concentração de 260 nM, e não apresenta aumento mesmo com o incremento das concentrações superiores (fig. 32). Não foram encontrados na literatura dados que expliquem este fenômeno. Porém, pode-se supor que ocorre a depleção das reservas intracelulares de cálcio, e com a perturbação da integridade da membrana plasmática, os sistemas de captação de cálcio extracelular podem estar danificados.

Tang também mostra que as variações dos níveis de Ca^{2+} são devidas tanto ao influxo de Ca^{2+} para dentro da célula como à liberação das reservas do íon pelo retículo endoplasmático. Aqui podemos levantar a hipótese de uma relação entre disfunção mitocondrial, elevação do Cálcio citoplasmático e danos posteriores à membrana plasmática.

De acordo com Jiahan Li e colaboradores, que estudaram os efeitos de QDS de CdTe sobre a mitocôndria (já citados neste trabalho), QDs de CdTe e CdSe desestabilizam o potencial de membrana e provocam abertura de poros na sua estrutura com extravasamento de fatores antes confinados ao seu interior. Vários destes compostos são pró-apoptóticos (ex. citocromo C e p53) e acionam o Cálcio para atuar como segundo mensageiro no desenvolvimento da resposta. Em 24 horas e nas maiores concentrações de QDs de CdTe/CdS-AMP observamos o

aparecimento de dano à membrana plasmática, o qual podemos sugerir ser reflexo dos eventos precoces ocorridos na mitocôndria e nos níveis de Ca^{2+} .

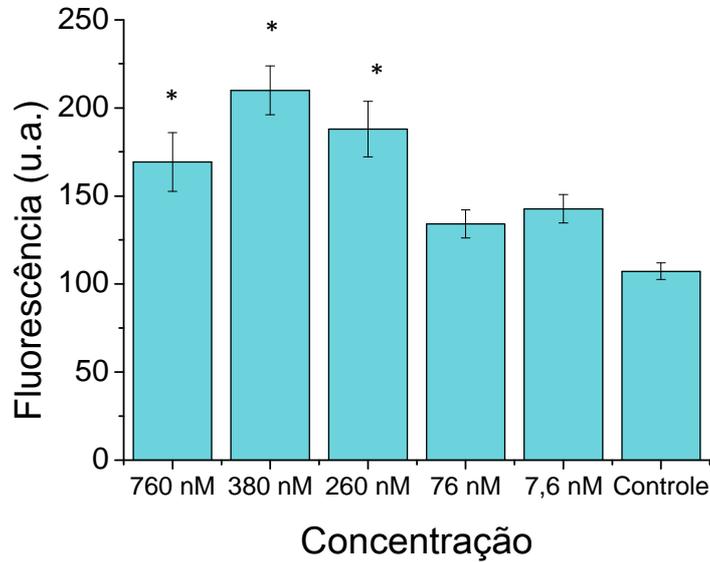


Fig. 33: Gráfico de intensidade de fluorescência após exposição das células à QDs de ZnSe por 2 horas.

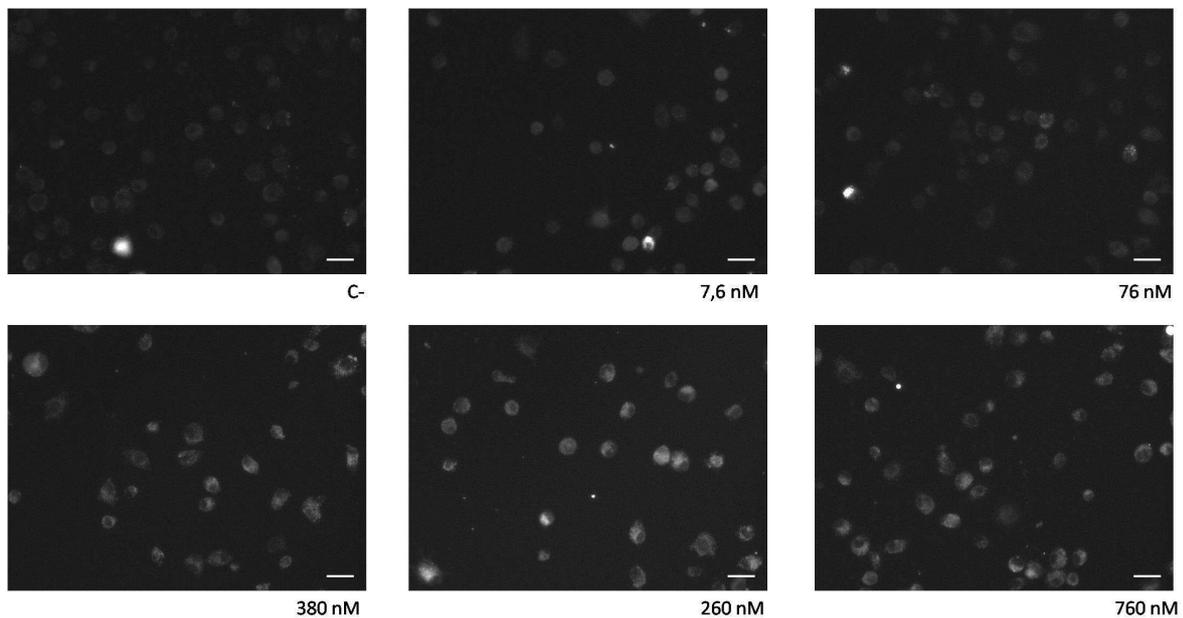


Figura 34: Imagens de células marcadas com Fluo3 e expostas à QDs de ZnSe/ZnS-AMS.

Podemos observar através das Figuras 33 e 34, que esta intensidade de fluorescência é ainda menor quando o QD utilizado é de ZnSe-AMS. Não há

diferença significativa entre as concentrações abaixo de 260 nM e controle segundo o teste estatístico.

5.6 Imagens

As imagens feitas em microscopia confocal e de fluorescência convencional, após 24 horas de exposição às nanopartículas em concentrações de 760 nM e 76 nM mostram a sua interação na superfície celular, assim como sua acumulação em vesículas citoplasmáticas (figuras 35, 36 e 37). As marcações com CdTe se mostraram distribuídas de forma mais homogênea pela célula mostrando provavelmente marcação de membrana e endocitose. Já a fluorescência do ZnSe parece estar mais localizada pontualmente em vesículas. Vale ressaltar que a concentração utilizada para se ter essa boa marcação foi maior que a IC_{50} para os três tipos de *QDs*. É interessante notar que a imagem com CdTe-AMS (Fig. 33) apresenta fluorescência no vermelho e no verde, sendo que a emissão original desse *QD* é na região do vermelho. A fluorescência no verde parece vir de vesículas, como se a célula estivesse metabolizando o *QD* e ele passasse a emitir no verde, em decorrência do seu tamanho estar sendo diminuído durante esse processo.

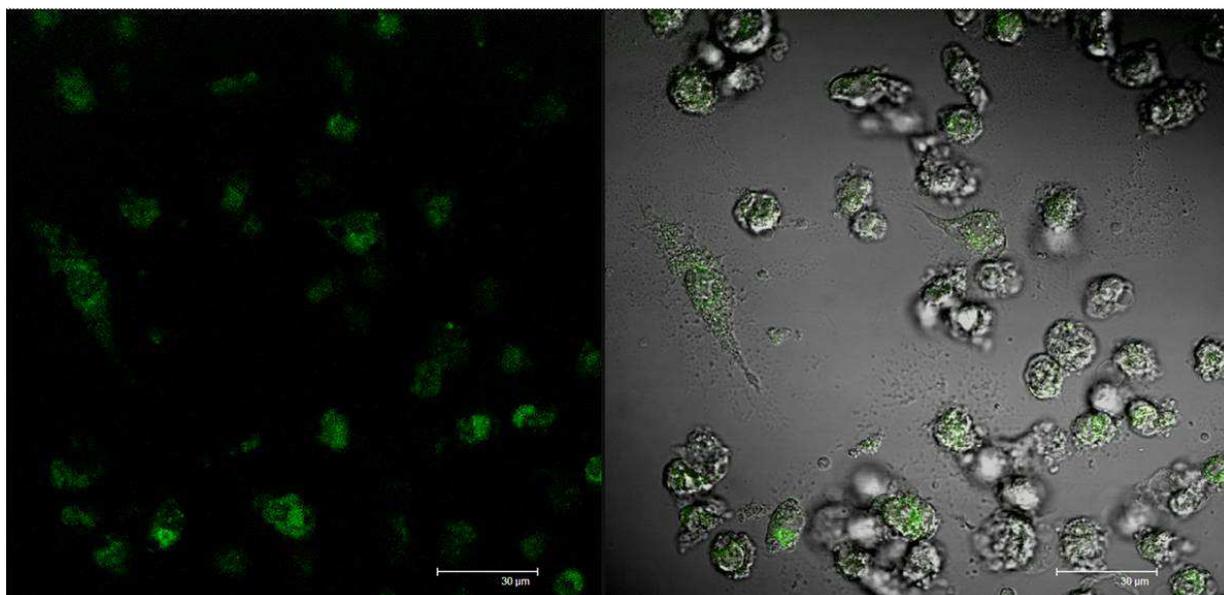


Figura 35: Marcação com CdTe/CdS-AMP após 24 horas de exposição em microscopia confocal. Excitação em 488 nm. Escala = 30 µm.

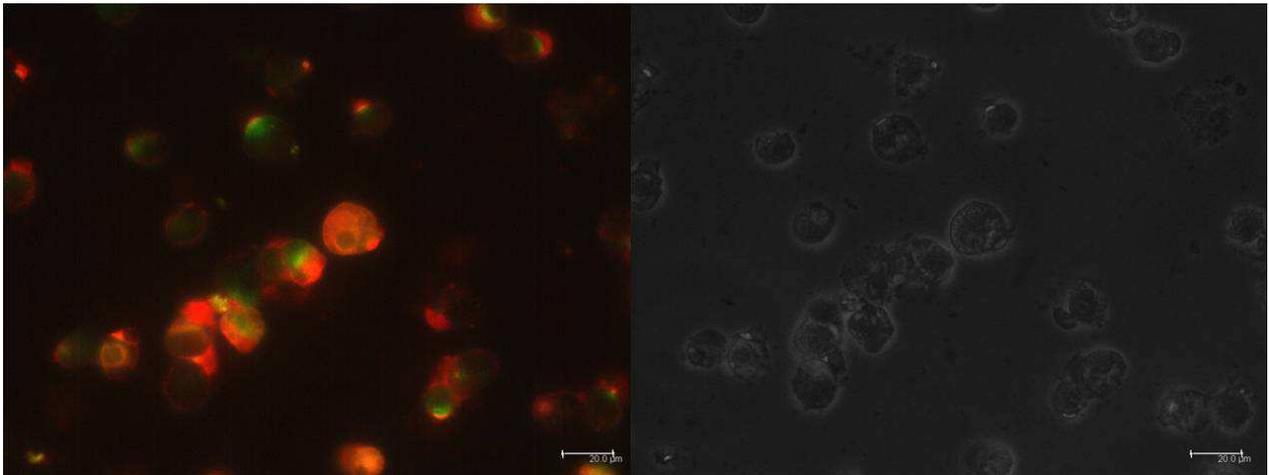


Figura 36: Marcação de células com CdTe/CdS-AMS após 24 horas de exposição em microscopia de fluorescência. Filtros L5 e TX2. Escala = 20 µm.

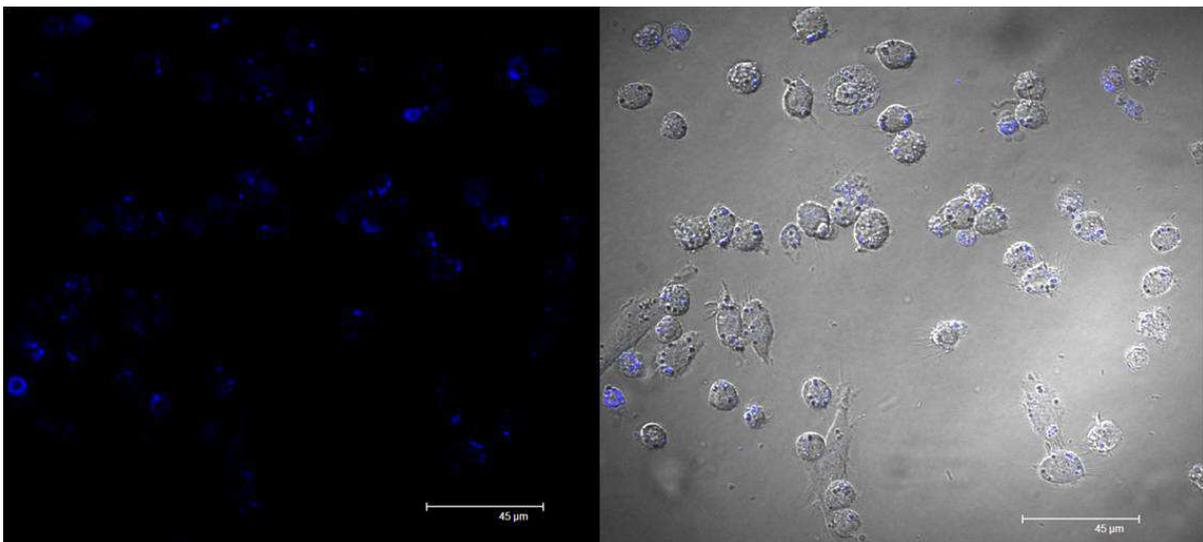


Figura 37: Marcação de células com ZnSe após 24 horas de exposição. Excitação em 405 nm por microscopia confocal. Escala: 45 µm.

6 CONCLUSÕES

A caracterização óptica foi obtida com sucesso, mostrando nanopartículas fluorescentes verde e no laranja de CdTe de tamanhos 2,61 nm e 3,1 nm respectivamente. A caracterização óptica dos QDs de ZnSe mostrou, que apesar de fluorescentes, esses QDs ainda apresentam defeitos de superfície evidenciado pelo largo espectro de emissão.

Concluimos que a IC₅₀, estimada através do teste de MTT para os QDs de CdTe tanto de AMP como AMS, se encontra na concentração aproximada de 76 nM. A viabilidade variou de aproximadamente 40 a 80% para a maior e menor concentração utilizada. Os QDs de ZnSe apresentaram-se menos tóxico, visto que a IC₅₀ foi estimada em 380 nM, revelando uma perspectiva promissora para o seu uso *in vivo*. No entanto sua excitação na região do UV e emissão no azul podem ser fatores limitadores.

Não há dano à membrana plasmática evidenciado pela marcação com Iodeto de Propídeo na concentração e tempo de exposição utilizados (IC₅₀ do CdTe) para todos os QDs. Porém, em concentrações maiores (760 e 380 nM) observa-se redução significativa da viabilidade celular (de 70 e 30%).

As nanopartículas com Cádmio causaram fragmentação do DNA e bloqueio da progressão do ciclo celular. QDs de CdTe e ZnSe diminuíram o número de células que entra na fase S, enquanto que para os QDs de ZnSe o comportamento foi mais parecido com o controle. Todas as nanopartículas foram capazes de elevar os níveis de Cálcio intracelular a partir de concentrações acima de 76 nM (para QDs de CdTe-AMP e CdTe-AMS) e 260 nM para QDs de (ZnSe-AMS).

Em conjunto esses resultados mostram que os QDs de CdTe apresentam toxicidade consideravelmente maior que os de ZnSe para as células RAW 264.7, sendo essa independente do agente estabilizante/funcionalizante ou tamanho do QD. Isso indica que essa toxicidade está provavelmente ligada à liberação do cádmio.

Com relação ao CdTe, acredita-se que danos posteriores à membrana plasmática nessas células podem ser reflexo dos eventos precoces ocorridos na mitocôndria e nos níveis de Ca²⁺.

De acordo com os dados obtidos e analisados neste trabalho podemos concluir que nanopartículas fluorescentes de CdTe/CdS-AMP, CdTe/CdS-AMS bem como de

ZnSe/ZnS-AMS podem apresentar toxicidade em maior ou menor grau e podem provocar alterações metabólicas e morte celular em culturas de células da linhagem RAW 264.7 *in vitro*.

7 PERSPECTIVAS

Como perspectivas deste trabalho ficam a ampliação de testes como os de viabilidade por exclusão de PI para mais concentrações de todas as partículas, além do desenvolvimento de outra metodologia para mensuração de Óxido Nítrico. Análises se tipo de morte celular, assim como investigação da morfologia por microscopia eletrônica podem complementar e ajudar a elucidar alguns processos observados.

A definição do caráter toxicológico de qualquer agente é multifatorial, e portanto mais estudos são necessários para compreender sua ação e afirmar a segurança do seu uso. Ainda são necessários muitos testes específicos para a compreensão dos mecanismos que desencadeiam danos em sistemas biológicos.

8 REFERÊNCIAS

1. Kurt Nassau. The Physics and Chemistry of Color: the 15 Mechanisms. 2003, Pages 247–280.
2. Serviço Geológico do Brasil, 2013 (www.cprm.gov.br).
3. SANTOS, B. S.; FARIAS, P. M. A.; FONTES, A.; “Semiconductor QantumDots for Biological Applications, Ed. Mohamed Henine. Hand Book of Selfassembled semiconductor nanostructure novel devices in photonics and electronics, Elsevier 2008. p 773-798.
4. Timothy Jamieson, Raheleh Bakhshi, Daniela Petrova, Rachael Pocock, Mo Imani, Alexander M Seifalian. Biological applications of *Quantum Dots*. Biomaterials 2007; 28(31):4717-32.
5. Chan WCW, Maxwell DJ, Gao XH, Bailey RE, Han MY, Nie SM. Luminescent *Qantum Dots* for multiplexed biological detection and imaging. Curr Opin Biotechnol 2002;13:40–6.
6. Lira *et al* Estudo Da Interação De *Quantum Dots* ComCélulas E Direcionamento Intracelular Mediado Por Lipossomas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, 2010.
7. Han MY, Gao XH, Su JZ, Nie S. Quantum-dot-tagged microbeads for multiplexed optical coding of biomolecules. Nat Biotechnol 2001;19:631–5.
8. X. Michalet, F. Pinaud, L. Bentolila, J. Tsay, S. Doose, J. Li, G. Sundaresan, A. Wu, S. Gambhir, S. Weiss, *Qantum Dots* for live cells, *in vivo* imaging, and diagnostics, Science 307 (2005) 538–544.
9. J. Xiao, L. Chen, F. Yang, C. Liu, Y. Bai, Green, yellow and red emitting CdTe QDs decreased the affinities of apigenin and luteolin for human serum albumin *in vitro*, J. Hazard. Mater. 69 (2010) 6–703.
10. ROGACH, A. L.; FRANZL; T., KLAR, T. A.; FELDMANN, J.; GAPONIK, N.; LESNYAK, V.; SHAVEL, A.; EYCHMÜLLER, A.; RAKOVICH, Y. P.; DONEGAN, J. F.; “Aqueous Synthesis of Thiol-Capped CdTe Nanocrystals: State-of-the-Art”, *J. Phys. Chem. C* 111, 14628-14637 (2007).
11. Wu, M. X.; Liu, H.; Liu, J.; Haley, K. N.; Treadway, J. A.; Larson, J. P.; Ge, N.; Peale, F.; Bruchez, M. P. Nature Biotechnol. 2003, 21, 41-46.
12. Dahan, M.; Levi, S.; Luccardini, C.; Rostaing, P.; Riveau, B.; Triller, A. Science 2003, 302, 442-445.

13. Lidke, D. S.; Nagy, P.; Heintzmann, R.; Arndt-Jovin, D. J.; Post, J. N.; Grecco, H. E.; Jares-Erijman, E. A.; Jovin, T. M. *Nature Biotechnol.* 2004, 22, 198-203.
14. Parak, W. J.; Boudreau, R.; Gros, M. L.; Gerion, D.; Zanchet, D.; Micheel, C. M.; Williams, S. C.; Alivisatos, A. P.; Larabell, C. A. *Adv. Mater.* 2002, 14, 882-885.
15. Kleina, S.; Zolkb, O.; Frommb, M.F.; Schrödlc, F.; d, W.; Neuhuberc, C.; Kryschia. Functionalized silicon quantum dots tailored for targeted siRNA delivery. Volume 387, Issue 1, 11 September 2009, Pages 164–168.
16. Masatoshi Okamoto, Fei Feng, Tatsuya Ohyanagi, Noriko Nagahori, Kazuhiko Someya, Yoshihiro Sakoda, Nobuaki Miura, Shin-Ichiro Nishimura, Hiroshi Kida. Fluorescence polarization-based assay using N-glycan-conjugated quantum dots for screening in hemagglutinin blockers for influenza A viruses. Volume 187, Issue 2, February 2013, Pages 390–394.
17. Pankhurst, Q. A.; Connolly, J.; Jones, S. K.; Dobson, J. J. *Phys. D* 2003, 36, R167-R181.
18. Ballou, B.; Lagerholm, B. C.; Ernst, L. A.; Bruchez, M. P.; Waggoner, A. S. *Bioconjugate Chem.* 2004, 15, 79-86.
19. Kim, S.; Lim, Y. T.; Soltesz, E. G.; Grand, A. M. D.; Lee, J.; Nakayama, A.; Parker, J. A.; Mihaljevic, T.; Laurence, R. G.; Dor, D. M.; Cohn, L. H.; Bawendi, M. G.; Frangioni, J. V. *Nature Biotechnol.* 2004, 22, 93-97.
20. Alivisatos, A.P. Less is More in Medicine. *Scientific American*; 285(3):59-65. 2001.
21. Service, R. F. Is Nanotechnology Dangerous? *Science* 2000, 290, 1526-1527.
22. Kondoh, M.; Araragi, S.; Sato, K.; Higashimoto, M.; Takiguchi, M.; Sato, M. *Toxicol.* 2002, 170, 111-117.
23. Limaye, D. A.; Shaikh, Z. A. Cytotoxicity of cadmium and characteristics of its transport in cardiomyocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1999, 154, 59-66.
24. RIKANS LE, YAMANO T. Mechanisms of cadmium mediated acute hepatotoxicity. *J Biochem Mol Toxicol* 2000; 14: 110-11.
25. Santone, K. S.; Acosta, D.; Bruckner, J. V. *J. Toxicol. Environ. Health* 1982, 10, 169-177.
26. Lopez, E.; Figueroa, S.; Oset-Gasque, M. J.; Gonzalez, M. P. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced by cadmium in cortical neurons in culture. *Br. J. Pharmacol.* 2003, 138, 901-911.
27. Ghitescu, L.; Fixman, A. J. Anionized and cationized hemeundecapeptides as probes for cell surface charge and permeability studies: differentiated labeling of endothelial plasmalemmal vesicles. *Cell Biol.* 1984, 99, 639-647.

28. Jordan, A.; Scholz, R.; Wust, P.; Schirra, H.; Schiestel, T.; Schmidt, H.; Felix, R. *J. Magn. Magn. Mater.* 1999, 194, 185-196.
29. Kloepfer, J. A.; Mielke, R. E.; Wong, M. S.; Neelson, K. H.; Stucky, G.; Nedeau, J. L. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003, 69, 4205-4213.
30. Lam, C.-W.; James, J. T.; McCluskey, R.; Hunter, R. L. *Toxicol. Sci.* 2004, 77, 126-134.
31. Warheit, D. B.; Laurence, B. R.; Reed, K. L.; Roach, D. H.; Reynolds, G. A. M.; Webb, T. R. *Toxicol. Sci.* 2004, 77, 117-125.
32. Derfus, A.M., Chan, W.C.W., Bhatia, S.N., 2004. Probing the cytotoxicity of semiconductor *Quantum Dots*. *Nano Lett.* 4, 11–18.
33. Tang, M.L., Xing, T.R., Zeng, J., Wang, H.L., Li, C.C., Yin, S.T., Yan, D., Deng, H.M., Liu, J., Wang, M., Chen, J.T., Ruan, D.Y., 2008. Unmodified CdSe *Quantum Dots* induce elevation of cytoplasmic calcium levels and impairment of functional properties of sodium channels in rat primary cultured hippocampal neurons. *Environ. Health Persp.* 116, 915–922.
34. Ming Yana, Yun Zhanga, Kedi Xua, Tao Fub, Haiyan Qinb, Xiaoxiang Zhenga An *in vitro* study of vascular endothelial toxicity of CdTe *Quantum Dots*. *Toxicology*, 282 (2011) 94-103.
35. Shiohara, A., Hoshino, A., Hanaki, K., Suzuki, K., Yamamoto, K., 2004. On the cytotoxicity caused by *Quantum Dots*. *Microbiol. Immunol.* 48, 669–675.
36. Lovric, J., Bazzi, H.S., Cuie, Y., Fortin, G.R.A., Winnik, F.M., Maysinger, D., 2005. Differences in subcellular distribution and toxicity of green and red emitting CdTe *Quantum Dots*. *J. Mol. Med.* 83, 377–385.
37. Chang, S.Q., Dai, Y.D., Kang, B., Han, W., Mao, L., Chen, D., 2009. UV-enhanced cytotoxicity of thiol-capped CdTe *Quantum Dots* in human pancreatic carcinoma cells. *Toxicol. Lett.* 188, 104–111.
38. Valadares, C.M. Acute toxicity evaluation: strategies post “DL50 test era”. *Revista Eletrônica de Farmácia Vol 3(2)*, 93-98, 2006.
39. A.O. Choi, S.J. Cho, J. Desbarats, J. Lovri, D. Maysinger, *Quantum Dots*-induced cell death involves Fas upregulation and lipid peroxidation in human neuroblastoma cells, *J. Nanobiotechnol.* 5 (2007) 1.
40. L. Wang, H. Zheng, Y. Long, M. Gao, J. Hao, J. Du, X. Mao, D. Zhou, Rapid determination of the toxicity of *Quantum Dots* with luminous bacteria, *J. Hazard. Mater.* 177 (2010) 1134–1137.

41. Z. Lu, Y. Qiao, X.T. Zheng, M.B. Chan-Park, C.M. Li, Effect of particle shape on phagocytosis of CdTe *Quantum Dots*–cystine composites, *MedChemComm* 1 (2010) 84–86.
42. Q. Xiao, S. Huang, Z.D. Qi, B. Zhou, Z.K. He, Y. Liu, Conformation, thermodynamics and stoichiometry of HSA adsorbed to colloidal CdSe/ZnS *Quantum Dots*, *BBA Proteins. Proteom.* 1784 (2008) 1020–1027.
43. M. Green, E. Howman, Semiconductor *Quantum Dots* and free radical induced DNA nicking, *Chem. Commun.* 12 (2005) 1–123.
44. Su, Y.Y., He, Y., Lu, H.T., Sai, L.M., Li, Q.N., Li, W.X., Wang, L.H., Shen, P.P., Huang, Q., Fan, C.H., 2009. The cytotoxicity of cadmium based, aqueous phase – synthesized, *Quantum Dots* and its modulation by surface coating. *Biomaterials* 30, 19–25.
45. Y. Zheng, S. Gao, J.Y. Ying. Synthesis and Cell-Imaging Applications of Glutathione-Capped CdTe *Quantum Dots* *Advanced Materials* Volume 19, Issue 3, pages 376–380, February, 2007.
46. Fengjuan Li, Aiping Zhu, Xiaoli Song, Lijun Ji, Juan Wang. The internalization of fluorescence-labeled PLA nanoparticles by macrophages. Volume 453, Issue 2, 10 September 2013, Pages 506–513.
47. Yuriko Higuchi, Machiko Oka, Shigeru Kawakami, Mitsuru Hashida Mannosylated semiconductor *Quantum Dots* for the labeling of macrophages. *Journal of Controlled Release*. Volume 125, Issue 2, 22 January 2008, Pages 131–136
48. Martin J. D. Clift, Matthew S. P. Boyle, David M. Brown, Vicki Stone. An investigation into the potential for different surface-coated *Quantum Dots* to cause oxidative stress and affect macrophage cell signalling *in vitro*. June 2010, Vol. 4, No. 2, Pages 139-149.
49. Abbas, A.K.; Lichtman, A.H. Células e tecidos do Sistema Imunológico. In: Abbas, A.K.; Lichtman, A.H. *Imunologia Celular e Molecular*. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p.26-28, 2005.
50. W. C. Raschke S . Baird P. Ralph and I . Nakoinz. Functional Macrophage Cell Lines Transformed by Abelson Leukemia Virus. *Cell*, Vol . 15, 26 1 -267, September 1978.
51. Auger, M.J., Ross, J.A. The biology of the macrophages. In: *The natural immune system: the macrophage*. Eds. C.E. Lewis & J.O.D. McGee, IRL Press, Oxford, New York, Tokio, p.1-57, 1992.
52. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. Free radicals reactive species and toxicology. *Free radicals in biology and medicine*, New York: Oxford University Press, p.544-616, 1999.

53. Klimp, A.H. *et al.*; A potencial role of macrophage activation in the treatment of cancer. *Critical Reviews in Oncology / Hematology*, in press, 2001.
54. Dinarello, C. A. Biological basis for interleukin-1 in disease. *Blood*. v.87, p. 2065-2147, 1996.
55. Sporn, S.A.; Eierman, D.F.; Johnson, C.E.; Morris, J.; Martin, G.; Ladner, M.; Haskill, S. Monocyte adherence results in selective induction of novel genes sharing homology with mediators of inflammation and tissue repair. *J Immunol*; 1990; 144,: 4434-4441.
56. De La Fuente M., Del Rio M., Ferrandez M.D., Hernanz A. Modulation of phagocytic function in murine peritoneal macrophages by bombesin, gastrin-releasing peptide and neuromedin C. *Immunol* 1991; 73:205-211.
57. Holgate, S.T., Church, M.K. *Allergy*. Trad Oliveira Ng. Manole, São Paulo, p 7.1-7.7; 1996.
58. Aderem, A., Underhill, D.M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol*, v. 17, p. 593-623, 1999.
and colocalize with experimental gliomas. *Neurosurgery*. 2007 Mar;60(3):524-9; discussion 529-30.
59. Zapolska-Donar, D. *et al.* Ibuprofen in hibits adhesiveness of monocytes to endothelium and reduces cellular oxidative stress in smokers and no-smokers. *Eur J Clin Invest.*,v. 30, p. 1002-1010, 2000.
60. Sampaio, S.C.; Espriamento, fagocitose, atividade fungicida e metabólitos reativos do oxigênio e do nitrogênio – Como avaliar função de macrófagos. *Como cultivar células*, Peris Curi; 2005
- 61 Swanson, J.A., Baer, S.C., Phagocytosis by zippers and triggers. *Trends in cell biology*, v.5, p. 89-93, 1995.
62. Bauerle, P.A.; Rupec, R.A.; Pahl, H.L. Reactive oxygen intermediates as second messengers of a general pathogen response. *Pathol Biol.*, v. 44, n. 1, p. 29-35, 1996.
63. Pithon-Curi, T.C. *et al.* Glutamine plays a role in superoxide production and the expression of p47phox, p22phox and gp91phox in rat neutrophils. *Clin Sci.*, v.103, n.4, p.403-8, 2002. SPRINGALL, D.R.; Nitric oxide - Friend and foe. *editorial. Journal Pathology*, v.175, p.165-166, 1995.
64. Poirier O, Nicaud V, McDonagh T, Dargie HJ, Desnos M, Dorent R, Roizès G, Schwartz K, Tiret L, Komajda M, Cambien F. Polymorphisms of genes of the cardiac calcineurin pathway and cardiac hypertrophy. *Eur J Hum Genet*. 2003 Sep;11(9):659-64.
65. M. Giacomello, M. Campeol. Indicators of Intracellular Calcium. *Encyclopedia of Biological Chemistry*, 2nd edition, Pages 574–579, 2013.

66. Junqueira e Carneiro *Biologia Celular e Molecular*, 3ª Ed. Guanabara, KOOGAN Rio de Janeiro, 1983.
67. 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. *Toxicology in vitro*. v. 13, pp. 665–673, 1999.
68. De Castro, C. M. M. B. ; Aguiar, J. L. A. ; D., M. F. ; M., L. E. ; B., S. D. Citotoxicidade De Biopolímero De Cana De Açúcar. *Anais Da Faculdade De Medicina (Universidade Federal De Pernambuco. Impresso)*, Recife, V. 49, N.2, P. 119-124, 2004.
69. Isabel C. C. M. Porto, Danielle C. Oliveira, Renata A. Raele, Ketlin H.S. Ribas, Marcos A.J.R. Montes , Célia M.M.B. De Castro. Cytotoxicity of current adhesive systems: *In vitro* testing on cell cultures of primary murine macrophages. *Dental Materials* 2-7 (2011) 221–228.
- 70 www.sobiologia.com.br
71. <http://www.ucl.ac.uk/wibr/services/docs/cellcyc.pdf>
72. Donald T Ward. Calcium receptor-mediated intracellular signalling. *Cell Calcium*. Volume 35, Issue 3, March 2004, Pages 217–228.
73. www.lifetechnologies.com
74. W. William Yu, Lianhua Qu, Wenzhuo Guo, and Xiaogang Peng. Experimental Determination of the Extinction Coefficient of CdTe, CdSe, and CdS Nanocrystals. *Chem. Mater.* 2003, 15, 2854-2860.
75. Pinar Dagtepe; Viktor Chikan; Jacek Jasinski; and Valerie J. Leppert. Quantized Growth of CdTe *Quantum Dots*; Observation of Magic-Sized CdTe *Quantum Dots*. *J. Phys. Chem. C* 2007, 111, 14977-14983.
76. Lopez, E.; Figueiroa, S.; Oset-Gasque, M. J.; Gonzalez, M. P. *Br. J. Pharmacol.* 2003, 138, 901-911.
77. Jiahan Li, Yue Zhang, Qi Xiao, Fangfang Tian, Xiaorong Liu, Ran Li, Guangyuan Zhao, Fenglei Jiang, Yi Liu. Mitochondria as target of *Quantum Dots* toxicity. *Journal of Hazardous Materials* 194 (2011) 440–444.
78. Feng P, Liang JY, Li TL, Guan ZX, Zou J, Franklin R, Costello LC. Zinc induces mitochondria apoptosis in prostate cells. *Molecular Urology* [2000, 4(1):31-36]
79. Thomas A. Link; Gebhard von Jagow. Zinc Ions Inhibit the Qp Center of Bovine Heart Mitochondrial bc1 Complex by Blocking a Protonatable Group. Vol. 270, No. 42, Issue of October 20, pp. 25001–25006, 1995.

80. Kirk E. Dineley, Tatyana V. Votyakova and Ian J. Reynolds. Zinc inhibition of cellular energy production: implications for mitochondria and neurodegeneration. *Journal of Neurochemistry*, 2003, 85, 563–570.

81 Shuquan Chang, Bin Kang, Xiqin Liu, Yaodong Dai*, and Da Chen. The combined influence of surface modification, size distribution, and interaction time on the cytotoxicity of CdTe *Quantum Dotss* in PANC-1 cells. *Acta Biochim Biophys Sin* 2012, 44: 241–248

82 Choi AO, Brown SE, Szyf M, Maysinger D. Quantum dot-induced epigenetic and genotoxic changes in human breast cancer cells. *J Mol Med (Berl)*. 2008 Mar;86(3):291-302. Epub 2007 Oct 27.