

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA**

GRAZIELA DE PAULA FERREIRA DANTAS

**AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA *IN VITRO* DE NANOTUBOS DE
CARBONO DE PAREDES MÚLTIPLAS FUNCIONALIZADOS COM
POLIETILENOGLICOL EM LINHAGEM DE FIBROBLASTO DE
PULMÃO DE *HAMSTER* (V79-4)**

Belo Horizonte

2018

GRAZIELA DE PAULA FERREIRA DANTAS

AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA *IN VITRO* DE NANOTUBOS DE CARBONO DE PAREDES MÚLTIPLAS FUNCIONALIZADOS COM POLIETILENOGLICOL EM LINHAGEM DE FIBROBLASTO DE PULMÃO DE *HAMSTER* (V79-4)

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas, da Faculdade de Farmácia - Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para a obtenção do grau de Mestra em Análises Clínicas e Toxicológicas.

Área de concentração: Análises Clínicas e Toxicológicas

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Tagliati

Coorientadora: Dra. Estefânia Mara do Nascimento Martins

Belo Horizonte

2018

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter conduzido e abençoado meu caminho até o momento.

Aos meus familiares, por todo apoio e carinho. À minha mãe, Maria, pelos conselhos e orações.

Ao meu pai, Vicente, por todo carinho e incentivo. Aos meus filhos, Paula e Lucas, por sempre acreditarem e se orgulharem de mim. Ao meu amado esposo, Paulo, por sempre me apoiar em todos os momentos, sendo um verdadeiro exemplo de companheirismo.

Ao meu orientador Carlos, pela oportunidade e apoio. À minha coorientadora Estefânia, pela colaboração em todos os momentos, pela paciência, dedicação e estímulo. À prof. Farah, por todos os ensinamentos passados. Ao LQN (laboratório de química de nanoestrutura) do CDTN (Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear) pela parceria e disponibilização de recursos. À Prof. Adelina por toda ajuda e cooperação. Às colegas Lívia e Júlia, pela colaboração e apoio.

Ao Prof. Flávio do laboratório de Virologia Básica e Aplicada do ICB, por disponibilizar o microscópio de fluorescência, para que eu pudesse fazer as análises. À técnica Mirna, do laboratório de toxicologia da FAFAR, por sempre contribuir e estar disposta a ajudar. À Maria Fernanda, do laboratório de Fotoquímica da FAFAR, pela ajuda e disponibilização de alguns equipamentos.

À minha amiga Isabela, que sempre esteve comigo em todos os momentos, me incentivando e ajudando, desde a minha entrada na pós-graduação. À minha amiga Daniela, por todo apoio, incentivo e pelas longas conversas por *WhatsApp*. Aos colegas do LabTox, principalmente Larissa e Patrick, pela ajuda nos experimentos.

Aos membros da banca, pelas sugestões e contribuições.

E a todos aqueles, que direta ou indiretamente contribuíram para que eu pudesse alcançar meu objetivo.

Muito obrigado à todos!!

RESUMO

Os nanotubos de carbono (NTC) compreendem uma importante classe de materiais com excelentes propriedades físico-químicas, a qual tem recebido grande atenção em aplicações biológicas. Dados conflitantes em relação a seus efeitos citotóxicos têm sido relatados. Essa discrepância deve-se à falta de padronização de metodologias, as quais deveriam levar em consideração não somente a dose e o tempo de exposição ao agente, parâmetro bem estabelecido na toxicologia clássica, mas também as características intrínsecas dos NTC e seu comportamento na interface com o sistema biológico. Assim, apesar da grande quantidade de dados gerados nestes últimos 10 anos, sobre a toxicidade desses nanomateriais, a nanotoxicologia é ainda um grande desafio. O presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico dos nanotubos de carbono de paredes múltiplas, funcionalizados com polietilenoglicol (2 kDa) modificado com pireno (MWNT- PyPEG), após a exposição da linhagem celular fibroblasto de pulmão de *hamster* (V79-4). A pesquisa foi conduzida por meio dos métodos MTT e *Cell Titer Blue*®, para estimar a viabilidade celular e por meio dos testes cometa e ensaio de micronúcleos com bloqueio de citocinese citoma (CBMN-Cyt) com (+S9) e sem (-S9) ativação metabólica, para avaliar a genotoxicidade e mutagenicidade. Os resultados utilizando o método MTT, na faixa de concentrações testadas (1,2 a 18,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$), mostraram diminuição significativa na viabilidade celular das células tratadas com MWNT- PyPEG somente da concentração de 18,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em relação ao grupo controle ($P < 0,05$) em diferentes tempos (24, 48 e 72 h). O pireno-PEG e outras concentrações não demonstraram alteração na viabilidade celular em comparação ao grupo controle. A concentração de 18,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foi citotóxica, uma vez que a viabilidade celular estava abaixo da concentração inibitória de 50% (IC_{50}). Um efeito dose-resposta foi observado quando foram utilizadas concentrações de MWNT- PyPEG entre 9,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 18,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O ensaio *Cell Titer Blue*® realizado nas mesmas condições acima, entretanto por 24 h confirmou os resultados do MTT. Os resultados obtidos com o ensaio cometa e CBMN-Cyt (-S9) não demonstraram genotoxicidade e mutagenicidade em todas as concentrações testadas. No entanto, quando os MWNT- PyPEG foram submetidos ao ensaio CBMN-Cyt (+S9), o número de micronúcleos aumentou significativamente em relação ao controle negativo, mostrando-se similar ao controle positivo. Portanto, o processo de biotransformação dessas NP deve ser minuciosamente investigado, uma vez que esse sistema pode potencializar a interação das mesmas com o material genético, promovendo mutações e conseqüentemente levando ao processo de carcinogênese. Esses resultados mostram a necessidade e a importância de se fazer mais de um teste de genotoxicidade para avaliar a segurança de cada composto.

Palavras-chave: Nanotoxicologia. Nanotubos de carbono de paredes múltiplas. Polietilenoglicol. Viabilidade celular. Genotoxicidade. Mutagenicidade. V79-4.

ABSTRACT

Carbon nanotubes (CNT) comprise an important class of materials with excellent physicochemical properties, which have received great attention in biological applications. Conflicting data regarding their cytotoxic effects have been reported. This discrepancy is due to the lack of methodologies standardization, which should take into account not only the dose and time of exposure to the agent, a parameter well established in classical toxicology, but also the intrinsic characteristics of the CNT and their behavior at the interface with the system biological. Thus, despite the large amount of data generated in the last 10 years, on the toxicity of these nanomaterials, nanotoxicology is still a great challenge. The objective of this study was to evaluate the cytotoxic, genotoxic and mutagenic potential of multi walled carbon nanotubes, functionalized with polyethylene glycol modified with pyrene (MWNT- PyPEG), after exposure of the hamster lung fibroblast cell line (V79-4). The research was conducted using the MTT and Cell Titer Blue methods to estimate cell viability and by means of the CBMN-Cyt with (+S9) or without (-S9) metabolic activation tests and comet assay to evaluate the mutagenicity and genotoxicity. The MTT method, in the range of concentrations tested (1.2 to 18.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$), showed a significant decrease in the cellular viability of cells treated with MWNT- PyPEG at the concentration of 18.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ in relation to the control group ($P < 0.05$) at different times (24, 48 and 72 h). Pyrene-PEG and other concentrations showed no change in cell viability compared to the control group. The concentration of 18.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ was cytotoxic, since cell viability was below 50% inhibitory concentration (IC_{50}). A dose-response effect was observed when MWNT- PyPEG concentrations were used between 9.25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and 18.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The CellTiterBlue® assay performed under the same conditions above, and only within 24 h, confirmed the MTT results. Results obtained with the CBMN-Cyt (-S9) and comet assay did not demonstrate genotoxicity and mutagenicity in the concentrations tested. However, when the MWNT- PyPEG were subjected to the CBMN-Cyt (+S9) assay, the number of micronucleus increased significantly over the negative control, and was similar to the positive control. Therefore, the biotransformation process of these NPs must be carefully investigated, since this system can potentiate their interaction with the genetic material, promoting mutations and consequently leading to the process of carcinogenesis. These results show the need and importance of more than one genotoxicity test to evaluate the safety of each compound.

Keywords: Nanotoxicology. Multi-walled carbon nanotubes. Polyethylene glycol. Cell viability. Genotoxicity. Mutagenicity. V79-4.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Nanotubos de carbono.....	12
Figura 2 -	Possíveis destinos das células cultivadas com bloqueio da citocinese, após a exposição à agentes genotóxicos.....	24
Figura 3 -	Representação esquemática da proteína corona.....	26

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATP – Adenosina Trifosfato

BPL – Boas Práticas Laboratoriais

BraCVAM – Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos

CBMN-Cyt – *Cytokinesis-block micronucleus - Cytome*

CEN – *European Committee for Standardization*

CGNT – Coordenação-Geral de Micro e Nanotecnologias

CIN – Comitê Interministerial de Nanotecnologia

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico

ECHA – *European Chemicals Agency*

ECVAM – *European Centre for the Validation of Alternative Methods*

EU – Europa

EUA – Estados Unidos da América

FISH – *Fluorescent in Situ Hybridization*

ICCVAM – *Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods*

ILSI – *International Life Sciences Institute*

INCQS - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

ISO – *International Organization for Standardization*

JaCVAM – *Japanese Centre for the Validation of Alternative Methods*

KoCVAM – *Korean Centre for the Validation of Alternative Methods*

LNBio – Laboratório Nacional de Biociências

MCTIC – Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovação e Comunicação

MN – Micronúcleo

MTS – *[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -5-(3-carboxymethoxyphenyl) -2-(4-sulfophenyl) -2H-tetrazolium]*

MTT – *(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide)*

MWNT – *Multi walled carbon nanotube*

NANoREG - Abordagem europeia comum para o teste regulamentar de nanomateriais

NM – Nanomaterial

NP – Nanopartícula

NTC – Nanotubos de carbono

OCDE – *Organisation for Economic Co-operation and Development*

PEG – Polietilenoglicol

QRAS – *Quantitative Structure-Activity Relationships*

QRTS - *Quantitative Structure-Toxicity Relationships*

RENAMA – Rede Nacional de Métodos Alternativos

SWNT – *Single walled carbon nanotube*

WST-1 – *4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate*

XTT – *(2,3-Bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide)*

SUMÁRIO

1 Introdução	9
1.1 Nanotecnologia.....	10
1.2 Nanomedicina.....	11
1.3 Nanotubos de Carbono	12
1.4 Toxicologia de nanopartículas.....	14
1.5 Iniciativas governamentais a respeito da avaliação da segurança	15
1.6 Métodos alternativos ao uso de animais	18
1.7 Vantagens e desvantagens de testes toxicológicos <i>in vitro</i>	18
1.8 Citotoxicidade e genotoxicidade <i>in vitro</i>	20
1.8.1 Ensaio de citotoxicidade	20
1.8.2 Ensaio de genotoxicidade e mutagenicidade.....	21
1.9 Interações e penetração das nanopartículas nas células.....	24
2 Objetivos	28
2.1 Objetivo geral	28
2.2 Objetivos específicos	28
3 Artigo	29
4 Perspectivas	52
5 Referências Bibliográficas	53

1 Introdução

O desenvolvimento de nanomateriais (NM) para uma variedade de aplicações tecnológicas tem crescido muito nas últimas décadas e o seu uso em biomedicina tem representado alternativas promissoras para o tratamento e o diagnóstico de doenças, particularmente, para o câncer (MAURER-JONES & HAYNES, 2012). No entanto, a exposição crescente a esses NM tem despertado grande preocupação quanto aos seus efeitos toxicológicos (COSTA & FADEEL, 2016), impulsionando, com isso, a elaboração de atividades regulatórias destinadas a maximizar os benefícios dos produtos de interesse, minimizando seus riscos para a saúde humana e o meio ambiente. A compreensão dos fatores de riscos associados à exposição aos NM exige a ampliação de abordagens precisas e preditivas para a sua avaliação, ou seja, uma abrangência detalhada das formas como as substâncias alteram os sistemas biológicos e levam a resultados adversos (STURLA *et al.*, 2014; COSTA & FADEEL, 2016). Além disso, devido às questões éticas envolvendo os estudos com animais, às dificuldades inerentes a um delineamento experimental adequado e ao elevado custo das avaliações *in vivo*, as agências regulatórias têm estimulado o desenvolvimento de testes *in vitro* (métodos alternativos), utilizando diferentes linhagens de células de origem animal e humanas (DANESHIAN *et al.*, 2011; RICCARDI *et al.*, 2015).

Numerosos estudos de toxicidade têm sido realizados com NM, porém até o momento não resultaram na criação de um conjunto de regras ou metodologias aplicáveis a muitos dos novos produtos em desenvolvimento destinados a aplicações biomédicas (LAURENT, 2012). As variações das propriedades intrínsecas dos NM (tamanho, forma, área de superfície, funcionalização, características de dispersão, aspectos de aglomeração, concentração e o meio em que estão dispersos), bem como, as diferenças das condições experimentais (tempo de tratamento, condições da cultura celular e protocolo experimental específico para manipulação e dispersão de NM) contribuem para a existência de uma heterogeneidade substancial dos dados publicados (THONGKAM *et al.*, 2017; CIMBALUK *et al.*, 2018). Além disso, o efeito tóxico das nanopartículas é altamente dependente dos órgãos, e mais especificamente do tipo de célula, isso devido à variação na fisiologia celular (por exemplo, epitelial ou linfóide), estado de proliferação (células tumorais ou normais), características da membrana e características fagocitárias entre diferentes tipos de células (KONG *et al.*, 2011). Portanto, a nanotoxicologia ainda é uma nova ciência que, atualmente, está estabelecendo protocolos padrões e métodos de caracterização capazes de lidar com as peculiaridades das nanoestruturas (DAVEY *et al.*, 2007).

Dessa forma, o presente estudo buscou avaliar *in vitro* o potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico de nanotubos de carbono de paredes múltiplas, funcionalizados com polietilenoglicol (2 kDa) modificado com pireno, após a exposição da linhagem celular fibroblasto de pulmão de *hamster* (V79-4). Esse tipo de célula possui interessantes propriedades para ensaios de toxicologia, como fácil cultivo e manutenção, rápido crescimento e curto período de adaptação. Além disso possuem uma baixa frequência de mutações espontâneas (ROSA, 2008). O estudo foi conduzido através de métodos alternativos, recomendados pelas agências reguladoras, como os testes para avaliar a viabilidade celular através do MTT e *Cell titer blue*, os danos no DNA a partir do ensaio cometa e as mutações no DNA através do teste micronúcleo com bloqueio de citocinese – Citoma CBMN-Cyt, com (+S9) e sem (-S9) ativação metabólica. A utilização do CBMN- Cyt (+S9) é importante devido ao fato de algumas linhagens empregadas em ensaios *in vitro* não apresentarem a capacidade de metabolizar compostos xenobióticos, havendo muitas vezes, a necessidade da adição de sistemas exógenos para executar essa função como, por exemplo, a fração S9, que possibilita mimetizar as condições endógenas do organismo humano.

1.1 Nanotecnologia

A nanotecnologia corresponde à produção, caracterização e aplicação de estruturas, dispositivos e sistemas em escala nanométrica, ou seja, em nível molecular ou atômico (PASCHOALINO *et al.*, 2010; PRAMOD *et al.*, 2013; NAGAMUNE, 2017;). Segundo a Comissão Europeia, nanomateriais são definidos como um material natural, incidental ou manufaturado, contendo partículas em um estado não ligado, agregado ou aglomerado, para os quais 50% ou mais das partículas na distribuição de tamanho numérico, uma ou mais dimensões externas estão na faixa de tamanho de 1 nm-100 nm (PIPERIGKOU, 2016).

Embora o uso da nanobiotecnologia tenha se iniciado há anos, as propriedades químicas e físicas dos nanomateriais, bem como suas propriedades na interface nano-bio, só estão sendo minuciosamente investigadas nas últimas décadas (GUNSOLUS; HAYNES, 2015). A incorporação e o uso das nanopartículas em produtos de consumo tornaram-se cada vez mais comuns, desde que houve uma maior compreensão relacionada à amplitude das novas propriedades desses materiais (HAYNES, 2010). O uso crescente dos materiais nanoestruturados, com características melhoradas, e suas inovações tecnológicas, já estão transformando o presente e representam uma grande promessa para o futuro através do

desenvolvimento de uma sociedade humana modernizada com melhores condições de vida (LI *et al.*, 2014; SINGH *et al.*, 2014).

Entretanto, embora seja inquestionável que a nanobiotecnologia possa trazer inúmeros benefícios à vida humana, teme-se que ela também possa apresentar efeitos adversos ao meio ambiente e à saúde da população (AHMAD e ZHOU, 2017). Esse é um campo que ainda necessita muitas investigações, pois apesar do número volumoso de estudos sobre a síntese, purificação e funcionalização dos nanomateriais, bem como quanto à construção inteligente de nanocomplexos multifuncionais para diferentes aplicações, durante muitos anos a pesquisa sobre a nanotoxicidade em sistemas biológicos foi quase inexistente (DREZEK *et al.*, 2008; PUMERA, 2010; GUNSOLUS e HAYNES, 2016).

1.2 Nanomedicina

Uma das áreas de maior crescimento dentro da nanotecnologia é a nanomedicina, que vem revolucionando a saúde e a medicina com a proposição e a introdução de novas ferramentas diagnósticas e terapêuticas transformadoras (CARUSO *et al.*, 2012). A descoberta e o carregamento de novos fármacos, o imageamento *in vivo*, o diagnóstico e as novas abordagens terapêuticas, bem como, os biomateriais e a engenharia de tecidos são aplicações atuais e promissoras (SHI *et al.*, 2010).

Ao longo das últimas três décadas, cientistas desenvolveram estratégias de síntese e caracterização das propriedades físico-químicas de uma gama de NM, tais como: os nanomateriais de carbono (NTC), como por exemplo os fulerenos e os nanotubos de carbono e, mais recentemente, o grafeno, as nanopartículas inorgânicas (de ouro e magnéticas), nanopartículas poliméricas (micelas e quitosana), nanopartículas lipídicas sólidas, lipossomas e pontos quânticos, as quais possibilitaram o estudo e o desenvolvimento de nanocomplexos para diferentes bioaplicações. Dentre eles, os NTC têm apresentado importantes implicações no desenvolvimento de nanocomplexos para aplicações biomédicas e farmacêuticas, devido não só às suas propriedades estruturais, ópticas, mecânicas e eletrônicas intrínsecas, mas também, a sua habilidade de interagir com moléculas biológicas e terapêuticas e serem internalizados em diferentes tipos de células devido ao seu tamanho reduzido e à natureza química de sua superfície (KIM *et al.*, 2010; FABBRO *et al.*, 2012).

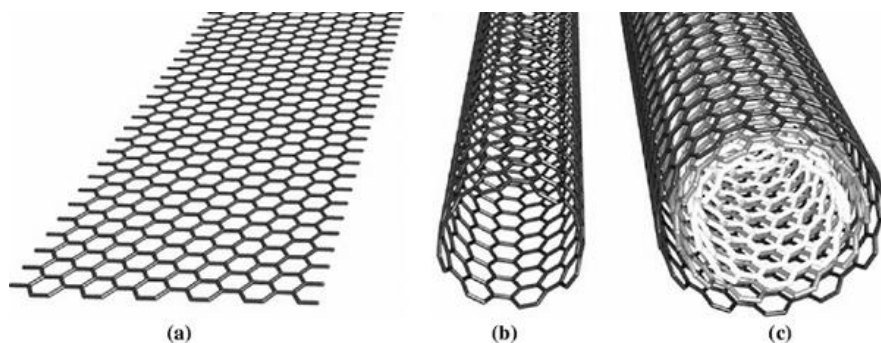
Além disso, a sua área superficial extremamente alta em relação ao seu volume e os múltiplos sítios de ligação, introduzidos a partir das modificações em sua superfície, favoreceram a incorporação de diferentes moléculas biológicas ativas e a geração de híbridos com alta especificidade e função biológica seletiva ou propriedades sinérgicas melhoradas, que podem ser exploradas em terapia gênica, imunoterapia, regeneração tecidual e diagnóstico de diferentes doenças (ZHAO & LIU, 2012).

1.3 Nanotubos de Carbono

Nanotubos de carbono (NTC) compreendem uma importante classe de materiais tecnológicos com excelentes propriedades físico-químicas, que tem recebido muita atenção desde sua primeira identificação estrutural no início dos anos 90 (EMA *et al*, 2017). Amplamente estudados e aplicados em engenharia eletrônica, materiais catalíticos e engenharia ambiental, esses NM também tem atraído considerável atenção na saúde e biologia (QI *et al*, 2017).

Os NTC são cilindros constituídos exclusivamente por átomos de carbono, dispostos em anéis hexagonais, com uma ou mais camadas de grafeno, com extremidades abertas ou fechadas (VOLDER *et al.*, 2013). Existem dois tipos principais de nanotubos de carbono que podem ter alta perfeição estrutural, os de parede simples (SWNT, do inglês *Single-Walled Nanotube*), que consistem em uma única folha de grafeno enrolada perfeitamente em um tubo cilíndrico e os de paredes múltiplas (MWNT, do inglês *Multi-Walled Nanotube*), que compreendem uma matriz de vários nanotubos concêntricamente dispostos (Figura 1) (BAUGHMAN *et al*, 2002).

Fig. 1 - Nanotubos de carbono. (a) Folha de grafeno; (B) Nanotubo de carbono de parede simples (SWNT); (c) Nanotubo de carbono de parede múltipla MWNT).



Fonte: KREUPL *et al.*, 2004.

Os SWNT e os MWNT geralmente são produzidos por descarga de arco de carbono, ablação a laser ou deposição química de vapor (tipicamente em partículas catalíticas). Seus diâmetros variam de 0,4 a 3 nm para SWNT e de 5 a pelo menos 100 nm para MWNT e suas propriedades podem ser ajustadas mudando-se o seu diâmetro e sua quiralidade (BAUGHMAN *et al.*, 2002; CHEN, 2010; SCARSELLI *et al.*, 2012).

Como mencionado anteriormente, esses NM vêm sendo extensivamente explorados em aplicações biomédicas e farmacêuticas, principalmente, como carreadores intracelulares de drogas quimioterápicas, proteínas e genes (LIU *et al.*, 2011), sendo, por exemplo, um sistema de entrega promissor para terapia antitumoral (TAN *et al.*, 2016). A sua área superficial extremamente alta em relação ao seu volume e os múltiplos sítios de ligação disponíveis favorecem a incorporação de diferentes moléculas, tais como peptídeos, proteínas, ácidos nucleicos e drogas terapêuticas podendo levar à geração de híbridos com alta especificidade e função biológica seletiva para diferentes bioaplicações. Entretanto, a natureza altamente hidrofóbica da superfície dos NTC e a sua capacidade de formar agregados insolúveis em soluções aquosas podem comprometer o desempenho do híbrido em um sistema biológico. (HE, *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2012; ZHU *et al.*, 2013, HEISTER, *et al.*, 2013,). Tais problemas podem ser contornados a partir da seleção de técnicas covalentes e não covalentes de modificações químicas da superfície dos NM (NOVOSELOV *et al.*, 2004), as quais podem contribuir para o aumento da solubilidade e capacidade de dispersão em meio aquoso, favorecendo a redução dos seus efeitos citotóxicos (SINGH *et al.*, 2011).

Nesse contexto, a peguilação tem sido amplamente investigada como uma abordagem de modificação de superfície, capaz de proporcionar a estabilização das nanopartículas em meio biológico, garantindo um perfil de circulação prolongada das mesmas na corrente sanguínea (ANDERSEN, 2009; GAMUCCI *et al.*, 2014). O polietilenoglicol (PEG) é um polímero sintético, formado por uma cadeia de poliéter capaz de adsorver água e estabelecer ligações de hidrogênio com o meio, permitindo assim a solubilização/dispersão de nanopartículas peguiladas em solventes polares, bem como sua estabilização em ambientes de pH ácidos ou básicos (GAMUCCI *et al.*, 2014). Esse revestimento ou funcionalização com PEG, também atua como uma barreira que bloqueia a adesão das opsoninas às nanopartículas, deixando-as camufladas frente às células fagocitárias, aumentando ainda mais sua biocompatibilidade, biodisponibilidade e diminuindo assim a sua citotoxicidade (OWENS; PEPPAS, 2006).

Os efeitos dos NTC e seus híbridos podem ser benéficos ou prejudiciais, sendo a reatividade biológica e a toxicidade dos mesmos altamente dependentes de inúmeros fatores intrínsecos, tais como: sua estrutura, comprimento, área de superfície, grau de agregação, topologia de superfície, extensão da oxidação, grupos funcionais introduzidos, método de síntese e impurezas, bem como de fatores extrínsecos, como a formação da proteína corona, a dose efetiva e o tempo de exposição, a via de inoculação, a via de reconhecimento dos NTC e dos híbridos e a sua interação com diferentes células e organismos vivos (VARDHARAJULA *et al.*, 2012; LANONE *et al.*, 2013; QI *et al.*, 2017). A citotoxicidade pode se manifestar a partir dos danos à membrana plasmática e ao DNA, morte celular (apoptose e necrose), estresse oxidativo, alterações nas atividades mitocondriais, rotas metabólicas intracelulares, e síntese proteica, dentre outras (VARDHARAJULA *et al.*, 2012).

1.4 Toxicologia de nanopartículas

A necessidade de novos enfoques para avaliar os potenciais de risco, ou seja, avaliar a segurança dos NMs, devido às suas propriedades físico-químicas peculiares deu origem à nanotoxicologia, que corresponde uma subdisciplina da toxicologia que se tornou bem estabelecida ao longo da última década e é atualmente uma das áreas de mais rápido desenvolvimento e de interesse toxicológico internacional (HOBSON, 2016). A mesma corresponde ao estudo das propriedades de toxicidade dos nanomateriais e seus mecanismos apropriados, e surgiu ao lado do crescente debate relacionado aos riscos à saúde humana e à segurança associados à nanotecnologia (CHEN *et al.*, 2013).

Ainda que grandes avanços tenham sido feitos, a nanotoxicologia atualmente enfrenta uma série de obstáculos e limitações técnicas, não associadas com toxicologia tradicional. Alguns dos desafios mais importantes incluem o estabelecimento de requisitos completos de caracterização, a padronização da dosimetria, a avaliação das taxas cinéticas de dissolução iônica, a melhora das eficiências preditivas *in vitro* e *in vivo* e o estabelecimento de limites de exposição de segurança (HUSSAIN, 2015).

Essas avaliações da segurança são necessárias, pois as novas características das NP que as tornam úteis em aplicações farmacêuticas, especialmente na distribuição de fármacos, e na imagem biomédica, podem acarretar riscos desconhecidos. Uma compreensão detalhada da interação de NP com células vivas, proteínas, hormônios ou fatores imunes é, portanto, fundamental para a sua longa viabilidade clínica e comercial. É importante entender como elas

reagem após a biodegradação dentro do corpo e se as NP (ou seus subprodutos) estão sujeitas à bioacumulação dentro das células ou órgãos, induzindo assim alterações intracelulares, ou respostas inflamatórias (HOBSON *et al.*, 2016). Nesse contexto, o desenvolvimento de plataformas de triagem de alto rendimento e testes de avaliação de segurança que proporcionem informações preditivas sobre relações estrutura-atividade são de suma importância (NEL, 2013). Uma biblioteca de segurança que liga as características físico-químicas ao potencial de risco pode aumentar a compreensão geral da segurança das NP e fornecer orientação para as fases iniciais do planejamento das mesmas.

Mesmo que a informação detalhada sobre as propriedades físicas das NP seja importante para a compreensão dos mecanismos de toxicidade e eficácia terapêutica, são os testes de segurança concretos que, em última instância, determinarão se um nanoterapêutico é adequado para aplicações clínicas (WOLFRAM, 2014). As relações entre identidade sintética (propriedades físico-químicas dos NMs) e a identidade biológica (adsorção de biomoléculas, incluindo proteínas ou lipídios, ou ambas, na superfície das nanopartículas) permitirão aos pesquisadores prever a resposta fisiológica de um NM (FADEEL *et al.*, 2015). Modelos quantitativos de estrutura-atividade ou toxicidade (QSAR ou QSTR) podem prever os pontos finais contínuos, por exemplo, doses letais, ou categóricas genotóxicas versus não genotóxicas, e podem reduzir a necessidade ou a extensão de testes em animais (WINKLER *et al.*, 2013).

Apesar das dificuldades inerentes relacionadas à caracterização toxicológica dos NM, estudos toxicológicos estão começando a destacar o papel que a estrutura das nanopartículas tem para desencadear e modular os efeitos adversos (SHVEDOVA *et al.*, 2010; RIVERA GIL *et al.*, 2010; MAYNARD *et al.*, 2011; WINKLER *et al.*, 2013).

1.5 Iniciativas governamentais a respeito da avaliação da segurança

Preocupações têm sido levantadas em relação aos potenciais riscos dos NPs para a saúde humana e para o meio ambiente. Essas preocupações estimulam o desenvolvimento de métodos de avaliação da segurança com o objetivo de avaliar riscos relacionados aos nanomateriais (BOHOLM; ARVIDSSON, 2016). Na atualidade, várias organizações internacionais estão avaliando informações e publicando documentos e guias em relação à segurança de nanomateriais visando a implantação de marcos regulatórios.

Há alguns anos, os governos dos Estados Unidos e da Europa vêm promovendo estudos que avaliam os impactos da nanotecnologia. Em 2004, a *Royal Society and Royal Academy of Engineering* da Grã-Bretanha publicou um relatório de pesquisa chave intitulado "Nanociência e nanotecnologias: oportunidades e incertezas". A principal recomendação do relatório foi focada em chamar a atenção dos cientistas sobre o desenvolvimento seguro, responsável e adequado dos nanomateriais (LAURENT, 2012).

Em 2005, com o objetivo de avaliar o estado atual sobre o conhecimento toxicológico das NP e, conseqüentemente, gerar diretrizes para a progressão desses materiais, "o *International Life Sciences Institute (ILSI), Research Foundation / Risk Science Institute*" reuniu um grupo de especialistas, cuja missão original seria o rastreamento e "identificação do perigo" após a exposição às NP. Além disso, reconheceu-se que pequenas diferenças nas propriedades físico-químicas desses, poderiam provocar uma resposta biológica única, levando ao desenvolvimento de técnicas de caracterização e a procedimentos padrões dos mesmos. A avaliação inicial do perigo, o desenvolvimento de ferramentas de caracterização fundamentais e o reconhecimento de modelos celulares adequados estabeleceram uma estrutura sólida para a inovação futura da engenharia de NP (HUSSAIN, 2015).

O *Swiss Federal Office of Health*, juntamente com o *Swiss Federal Office of Environment*, publicou um plano de ação intitulado "Nanomateriais Sintéticos". O plano proposto dá aos pesquisadores e usuários industriais de NP os meios pelos quais deve-se avaliar seus riscos potenciais. Porém, os estudos relacionados à investigação nanotoxicológica mostraram que as interações entre NP e células são extremamente complexas (LAURENT, 2012).

Em 2007, iniciou-se o Sétimo *Framework* da Comissão Europeia, e entre os projetos financiados, cinquenta centraram-se na avaliação da nanosseguurança. O projeto *NanoImpactNet* desempenhou um papel importante na integração da pesquisa de nanosseguurança na fase inicial do programa, através de *workshops* e conferências. Em uma dessas oficinas, os especialistas forneceram recomendações para a caracterização mínima dos nanomateriais e foi feita uma distinção entre "métricas essenciais", incluindo a distribuição de tamanho, composição química e carga de superfície, forma e solubilidade (FADEEL *et al.*, 2015).

O projeto *QualityNano* enfatizou a importância da padronização e harmonização de procedimentos em todos os aspectos da avaliação da nanosseguurança e, também, destacou a necessidade de caracterização *in situ* (DAWSON *et al.*, 2013; FADEEL *et al.*, 2015). O projeto

NANoREG, com cerca de 70 institutos parceiros, financiado pela Comissão Europeia e alguns Estados membros participantes, destina-se a facilitar e desenvolver uma abordagem comum aos testes regulamentadores de NMs. Nesse projeto, vários protocolos de caracterização baseados nas diretrizes da OCDE para análise de propriedades físico-químicas de nanomateriais foram verificados e validados (BLEEKER *et al.*, 2013; FADEEL *et al.*, 2015). O mesmo foi finalizado em 28 de fevereiro de 2017.

O Brasil começou a investir em métodos de teste de segurança de última geração, particularmente através do estabelecimento da Rede Nacional de Métodos Alternativos (RENAMA). Criada pelo Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTIC) em julho de 2012, o RENAMA recebeu R\$ 1,1 milhão em recursos do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e tem como objetivo disponibilizar métodos alternativos internacionalmente reconhecidos e desenvolver sua utilização, particularmente em toxicologia, por meio da criação de uma rede de laboratórios dotados de equipamentos e pessoal qualificado para usar esses métodos (LANGLEY *et al.*, 2017).

O RENAMA está estruturado por duas categorias de laboratórios. A primeira categoria é composta pelos Laboratórios Centrais (Instituto Nacional de Metrologia Qualidade e Tecnologia - INMETRO, o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - INCQS e o Laboratório Nacional de Biociências - LNBio). A segunda categoria é composta pelos Laboratórios Associados, públicos e privados. São dezenove laboratórios distribuídos pelos estados de Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro, Bahia, Pernambuco, Goiás e Minas Gerais (RENAMA, 2017). O laboratório de toxicologia LabTox, localizado na Faculdade de Farmácia, na Universidade Federal de Minas Gerais está participando ativamente desse processo.

Em relação ao *NANoREG*, a participação do Brasil neste projeto foi definida em setembro de 2014. A coordenação científica no Brasil foi o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (Inmetro), e a gestão no âmbito do governo ficou sob o comando da Coordenação-Geral de Micro e Nanotecnologias (CGNT) – vinculado ao Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI) – junto ao Comitê Interministerial de Nanotecnologia (CIN).

1.6 Métodos alternativos ao uso de animais

Em 1959, Russell e Burch mudaram o debate sobre o uso de animais experimentais, através da publicação do livro “*Principles of human experimental technique*”, no qual definiram a ciência humana com o conceito de 3Rs - substituição, redução e refinamento. A substituição é o conceito de utilização *in vitro* e outras técnicas de animais para abordar uma questão científica. A redução expressa o conceito de usar o menor número de animais sem comprometer a solidez científica e aborda a questão do planejamento experimental. Refinamento refere-se ao uso de técnicas e abordagens que eliminam ou diminuem a dor e o sofrimento vivenciados pelos animais experimentais (DANESHIAN *et al.*, 2011; KANDAROVA, 2011).

Atualmente, as ideias de "Princípios da técnica experimental humana" foram incorporadas nos regulamentos nacionais e internacionais. Essas ideias são defendidas por organizações de todo o mundo e têm um vasto impacto econômico. Para demonstrar que métodos alternativos podem ser pelo menos tão sensíveis, reprodutíveis e relevantes para prever os efeitos da saúde humana, instituições nacionais e supranacionais, tais como ICCVAM (USA), ECVAM (EU), JaCVAM, OECD e, mais recentemente, KoCVAM na Coreia e BraCVAM no Brasil, foram estabelecidos para validação de métodos alternativos. Essas instituições também funcionam com o objetivo de facilitar a implantação desses métodos em testes regulatórios, que são regidos por farmacopeias nacionais e supranacionais (DANESHIAN *et al.*, 2011).

Além disso, no Brasil o Conselho Nacional Brasileiro de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) iniciou o processo de regulamentação em julho de 2014. Ele estabeleceu o prazo de 5 anos para que o Brasil implementasse 17 métodos alternativos internacionalmente validados e reconhecidos pela Organização de Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) (RICCARDI *et al.*, 2015).

1.7 Vantagens e desvantagens de testes toxicológicos *in vitro*

Para o teste de toxicidade *in vitro*, seja de qualquer produto químico ou de nanopartículas, existe uma série de vantagens óbvias, dentre elas destacam-se o desejo ético de reduzir o teste em animais, a velocidade dos resultados e o custo relativamente menor comparado aos estudos *in vivo*. Em geral, muitos pesquisadores tendem a usar o sistema *in vitro* devido a sua simplicidade, facilidade de realização, controle e interpretação dos resultados. Alguns resultados analisados

in vitro podem muitas vezes refletir aqueles obtidos *in vivo*, como por exemplo, em relação à morfologia celular, a absorção de partículas, a sinalização celular, a expressão gênica e produção de proteínas. No entanto, outros parâmetros como alterações histológicas e efeitos no sistema imunológico são mais limitados e difíceis (STONE, 2009; MAURER-JONES & HAYNES, 2012).

A principal desvantagem que se observa em sistemas *in vitro* é a limitação com relação ao uso de somente um tipo de célula ou uma combinação de apenas alguns tipos de células. Em decorrência disto, um sistema *in vitro* não é capaz de replicar completamente as interações complexas que ocorrem entre vários tipos de células *in vivo*, tanto dentro de um órgão quanto também entre órgãos (STONE, 2009).

No entanto, como estudos *in vivo* e *in vitro* fornecem informações necessárias, e muitas vezes complementares, sobre a ação terapêutica com nanopartículas, ambas as diretrizes têm o potencial de aperfeiçoar o progresso tecnológico. Correlacionar os resultados permite uma compreensão mais profunda do modo de toxicidade das nanopartículas. Além disso, através dessas correlações, existe o potencial de simplificar as avaliações pré-clínicas porque os resultados de estudos *in vitro* podem permitir a generalização da resposta de toxicidade *in vivo*, reduzindo assim o tempo e o custo de desenvolver métodos terapêuticos altamente eficazes eliminando alguns testes em animais (MAURER-JONES & HAYNES, 2012).

Devido à constante expansão da produção de NP, atualmente existe a necessidade de desenvolver e validar ensaios *in vitro* para avaliar o potencial tóxico desses materiais. Uma vez que, se todas as novas NP fossem testadas em animais, levando em consideração as manipulações na composição, tamanho, formulação, contaminantes e rotas de exposição, então, centenas de milhares de animais seriam necessários para avaliar completamente o risco potencial desses materiais. Dessa forma, a identificação de ensaios *in vitro* que regulem com precisão a capacidade das nanopartículas para induzir efeitos tóxicos em seres humanos, têm sido constantemente investigados (STONE, 2009).

Alguns dos ensaios especificados pelas agências reguladoras têm demonstrado sucesso nos testes *in vitro*, dentre os quais se destaca o ensaio de genotoxicidade, que consiste na detecção de danos e mutações no DNA, e se baseia na exposição de células de mamíferos ao novo fármaco (TIMBRELL, 2009). Os ensaios de genotoxicidade e mutagenicidade *in vitro* e *in vivo*

constituem uma forma eficaz de determinar se o novo composto tem capacidade de interagir com o DNA, causar danos, provocar alterações nos cromossomos ou afetar a capacidade de reparo do DNA (KWON *et al.*, 2014; GEORGE *et al.*, 2017). Além disso, são ensaios de curta duração e acessíveis do ponto de vista econômico (SAWANT, FIELDEN e BLACK, 2014). Porém, essa capacidade de desencadear danos, muitas vezes é complexa, pois se expressa após vários anos, sendo necessários estudos de carcinogenicidade que são dispendiosos e de longa duração (NICOLETTE, 2013).

1.8 Citotoxicidade e genotoxicidade *in vitro*

1.8.1 Ensaio de citotoxicidade

O teste de citotoxicidade é realizado para determinar o efeito citotóxico de um produto químico ou medicamento, podendo ser usado também para estimar a dosagem inicial para um teste de toxicidade. O ensaio MTT é um ensaio colorimétrico quantitativo e confiável que determina a sobrevivência celular. O princípio desse ensaio baseia-se na redução do sal 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazólio), de cor amarela e solúvel em água, por células viáveis depois de serem tratadas com um produto químico ou dispositivo de teste. A succinato desidrogenase mitocondrial, nos locais do citocromo b e do citocromo c de células vivas converte o sal à formazan, um metabolito roxo e insolúvel em água. A solubilização do formazan por álcool ou sulfóxido de dimetilo (DMSO) pode ser medida quantitativamente, onde os resultados são proporcionais às células viáveis (STONE, 2009; MUSA *et al.*, 2012)

A seleção do ensaio de citotoxicidade apropriado é vital para a avaliação precisa da toxicidade das nanopartículas. Ao escolher o ensaio correto, todas as interferências potenciais devem ser consideradas, para que não seja obtidos resultados falso-positivos e falso-negativos. Interações entre as nanopartículas e o corante escolhido foram citados como uma grande interferência potencial que leva à resultados imprecisos. Uma avaliação aprofundada de todas as interferências potenciais, incluindo a faixa de absorbância das NP e as interações esperadas com componentes do ensaio, devem ser verificados antes de selecionar um ensaio de citotoxicidade. Portanto, para evitar interpretações erradas dos resultados, os dados de citotoxicidade devem ser verificados com pelo menos dois ou mais testes independentes (WÖRLE-KNIRSCH *et al.*, 2006; KONG *et al.*, 2011).

Vários compostos de tetrazólio têm sido utilizados para detectar células viáveis. Os mais frequentemente utilizados são MTT, MTS, XTT e WST-1. Esses se dividem em duas categorias: o MTT, que é carregado positivamente e penetra prontamente em células eucarióticas viáveis e os MTS, XTT, WST-1, os quais são carregados negativamente, o que dificulta sua penetração no interior das células. São tipicamente utilizados com um aceptor intermediário de elétrons que pode transferir elétrons da membrana plasmática ou citoplasma para facilitar a redução do sal tetrazólio a formazan (RISS *et al.*, 2013). Outros tipos de ensaios para avaliar a viabilidade celular também tem sido usados, tais como o teste para a avaliar a redução da resazurina em resorufina (conhecido como ensaio *alamar blue* ou *cell titer blue*), absorção do vermelho neutro (*Neutral red*) e atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH).

O *CellTiter-Blue*® fornece um método fluorimétrico homogêneo para estimar a viabilidade celular. Ele utiliza o corante resazurina (um indicador de viabilidade celular) para medir a capacidade metabólica das células. As células viáveis mantêm a capacidade de reduzir a resazurina (corante de cor azul) em resorufina (cor rosa), que é altamente fluorescente. As células não viáveis perdem rapidamente a capacidade metabólica, não reduzem o corante indicador e, portanto, não geram um sinal fluorescente (PROMEGA, 2013).

1.8.2 Ensaios de genotoxicidade e mutagenicidade

Os ensaios de genotoxicidade e mutagenicidade fornecem informações sobre a capacidade de um novo fármaco ou composto induzir danos ou mutações no ácido desoxirribonucleico (DNA) levando a alterações nos cromossomos, uma vez que um aumento da instabilidade genética está associado ao desenvolvimento do câncer. Estes ensaios são realizados, portanto, para permitir melhores estratégias de avaliação da segurança de novos compostos. Atualmente, muitos testes estão disponíveis para detectar mutações genéticas, mutações cromossômicas e efeitos aneugênicos (aneuploidia), bem como para medir a formação de quebras de cadeia de DNA, aductos de DNA e a indução de reparo de dano de DNA (STONE *et al.*, 2009; KARLSSON, 2010; KIRKLAND *et al.*, 2011; NICOLETTE, 2013).

1.8.2.1 Ensaio Cometa

O ensaio cometa, também conhecido como ensaio de eletroforese em gel de célula única, é um teste genotóxico amplamente utilizado, pois é rápido, simples, sensível, confiável e bastante barato (SINGH *et al.*, 2009; MUSA *et al.*, 2012; GUNASEKARANA *et al.*, 2015; HUK *et al.*, 2015). Esse teste é capaz de detectar quebras de DNA simples e duplas, que são indicadas pelo movimento de fragmentos de DNA de baixa massa molecular danificados, carregados negativamente, deixando um rastro semelhante a uma cauda de cometa (a cabeça compreendendo ao DNA não danificado e a cauda formada por fragmentos de DNA). Quanto maior o dano, maior a intensidade da cauda do cometa (UDROIU & SGURA, 2017). O dano do DNA desempenha um papel essencial na mutagênese, carcinogênese e envelhecimento (MUSA *et al.*, 2012; GUNASEKARANA *et al.*, 2015). Esse ensaio consiste na incorporação de células em uma suspensão de agarose com baixo ponto de fusão, lise celular em condições neutras ou alcalinas, eletroforese das células lisadas suspensas, coloração com um corante de ligação ao DNA fluorescente e aquisição de imagem (UDROIU & SGURA, 2017).

Ele vem sendo utilizado para estudos de toxicogenética, devido às suas peculiaridades e vantagens quando comparado a outros testes para detecção de substâncias genotóxicas. É utilizado para detectar apenas lesões genômicas, que após serem processadas podem resultar em mutação. Essas lesões, diferente das mutações, são passíveis de correção pelo sistema de reparo (SINGH *et al.*, 2009).

1.8.2.2 Ensaio de micronúcleos

O ensaio de MN, como marcador de dano cromossômico, é um ensaio bem estabelecido em toxicologia genética (FENECH, 2007). Ele é um dos ensaios mais amplamente aplicados para testar novos compostos, *in vitro* e *in vivo*, para fins regulatórios (OECD TG 487, 2014). O estudo de danos no DNA em nível cromossômico é uma parte essencial da Genética Toxicológica, uma vez que a mutação cromossômica é um evento importante na carcinogênese.

O teste baseia-se na identificação de algumas formas de mutações cromossômicas, a partir da detecção microscópica de um cromossomo ou fragmento cromossômico de uma célula, que não conseguiu se integrar no núcleo da célula filha após a divisão. A formação de MNs ocorre durante o processo de divisão celular, durante a telófase da mitose ou meiose, quando o

envelope nuclear é reconstituído ao redor dos cromossomos das células filhas. Dessa forma, os danos causados no DNA pela exposição a agentes mutagênicos só são expressos em MN após um ciclo de divisão celular. (FENECH *et al.*, 1997; FENECH, 2000; FENECH *et al.* 2007; SINGH *et al.*, 2009; UDROIU & SGURA, 2017).

No ensaio chamado de MN com bloqueio de citocinese citoma (CBMN-Cyt), o inibidor da actina, citocalasina B, é aplicado à cultura celular após o tratamento com o composto teste. Essa abordagem permite a quantificação dos níveis de micronúcleos, bem como a proliferação celular, distinguindo células mononucleares de células binucleadas, isto é, células que sofreram, ou não, divisão durante a cultura celular. Usando a hibridação fluorescente *in situ* (FISH) com sondas direcionadas para a região do centrômero, pode-se determinar se um micronúcleo específico representa um fragmento de cromossomo acêntrico (evento clastogênico) ou se ele contém um cromossomo inteiro (efeito aneugênico) (SINGH *et al.*, 2009; STONE *et al.*, 2009). Devido à sua confiabilidade e boa reprodutibilidade, o ensaio CBMN-Cyt tornou-se um dos testes citogenéticos padrão para testes de toxicologia genética em células humanas e de mamíferos (FENECH, 2007).

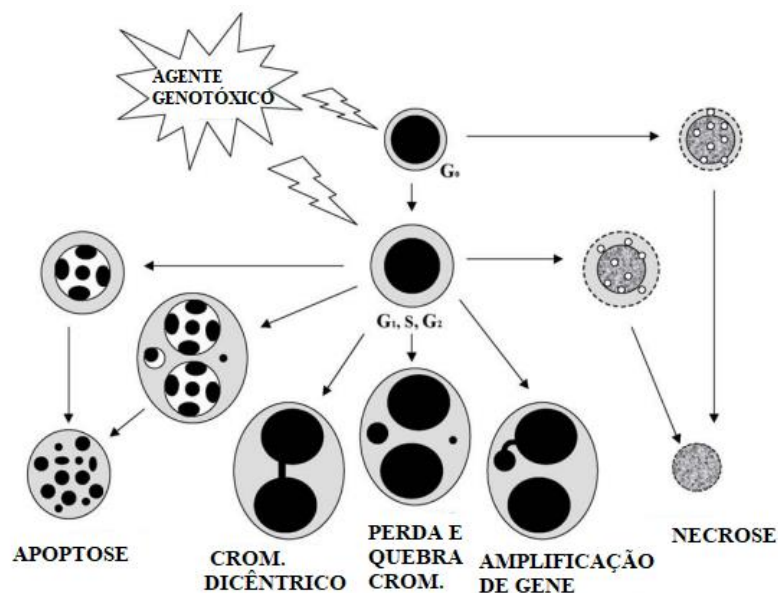
Ao longo dos últimos anos, houve uma evolução do método para avaliar os danos cromossômicos, sendo usado também para avaliar outros parâmetros, como pontes nucleoplasmáticas (NPBs – “*Nucleoplasmic Bridges*”), um biomarcador de cromossomos dicêntricos resultantes de fusões finais de telômeros ou malformação de DNA, brotos nucleares (NBUDs - “*Nuclear Buds*”), um biomarcador de amplificação de genes, necrose e apoptose (Figura 2). A técnica agora é denominada ensaio de MN com bloqueio de citocinase citoma (CBMN-Cyt). O conceito de "citoma" implica que cada célula do sistema é citologicamente avaliada pelo seu estado mitótico (mononucleada, binucleada ou multinucleada), pelo o seu estado de viabilidade (necrose e apoptose) e pelos seus danos cromossômicos ou estado de instabilidade (presença de MN, NPBs, NBUDs). (FENECH, 2006; FENECH *et al.* 2007).

O ensaio CBMN-Cyt (+S9) é empregado em células cuja a capacidade metabólica endógena é insuficiente. A fração S9 revela se o material em teste é mutagênico em sua forma original ou necessita ser metabolizado ou ativado para se tornar mutagênico. Trata-se de uma fração pós-mitocondrial comumente utilizada, geralmente obtida a partir do fígado de roedores tratados com agentes indutores (Aroclor 1254) (OECD 487, 2014) de enzimas do sistema P450,

acrescida de cofatores (KLANENDONK *et al.*, 2000). Esse sistema de ativação metabólica assemelha-se com o que ocorre na metabolização de moléculas (xenobióticos) do organismo humano. E, além disso, beneficia e favorece a extrapolação para o valores preditivos sobre as análises de risco em mutagenicidade (PLANT, 2004).

Dessa forma, o efeito carcinogênico potencial de produtos químicos pode ser convenientemente avaliado por sua capacidade de causar mutações, através de ensaios de genotoxicidade, uma vez que, a maioria dos agentes causadores de tumores é mutagênica e a determinação desse efeito em animais é um processo lento e dispendioso (WATSON *et al.*, 2015).

Fig. 2 – Possíveis destinos das células cultivadas com bloqueio da citocinese, após a exposição à agentes genotóxicos.



Fonte: FENECH, 2006

1.9 Interações e penetração das nanopartículas nas células

A maneira como as NP interagem com as membranas celulares e os mecanismos como são transferidos para dentro das células são muito importantes, não somente para entender sua toxicidade potencial, mas também para desenvolver métodos para garantir seu uso seguro. Vários fatores podem contribuir para a interação e, posteriormente, para a adsorção de nanomateriais na membrana celular, por exemplo, a forma, o tamanho e a natureza e concentração de grupos funcionais na superfície das nanopartículas, dentre outros (FANIZZA

et al., 2015). A presença de grupos carregados negativamente na sua superfície como o grupo COOH, por exemplo, poderia facilitar o transporte de MWNT através da membrana celular, com consequente acumulação dentro do citoplasma (COCCINI *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2012; JIANG *et al.*, 2013).

Os mecanismos de absorção celular dos NTC diferem-se de acordo com a suas características físico-químicas, como grau de dispersão, formação de complexos supramoleculares e comprimento, que são fatores cruciais para determinar o mecanismo exato. As vias pelas quais eles entram nas células, seu posterior tráfico intracelular e sua distribuição ainda não foram bem elucidadas. Em geral, existem três maneiras pelas quais os NTC podem entrar em uma célula: endocitose, fagocitose e difusão (RAFFA *et al.*, 2010; HANIU *et al.*, 2013; TSUKAHARA *et al.*, 2015).

A toxicidade de certas NP pode se manifestar a nível molecular, celular e tecidual. À medida que elas se movem através do corpo, podem ser expostas a diferentes microambientes biológicos, incluindo o sangue, a matriz extracelular, o citoplasma e organelas celulares. Consequentemente, as interações que ocorrem podem afetar a função das biomoléculas, componentes celulares e estruturas de tecido (WOLFRAM *et al.*, 2014 b).

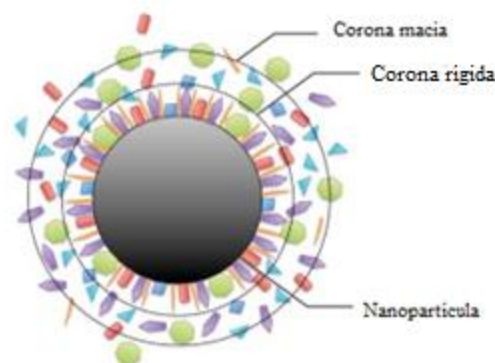
A probabilidade de internalização dos NM nas células e sua interação com o ambiente intracelular, como o núcleo, é muito alta devido ao seu tamanho. Essas interações podem danificar o DNA e levar a respostas genotóxicas caracterizadas por danos ou mutações que comprometem o bom funcionamento das células e, portanto, a sobrevivência. A genotoxicidade pode ocorrer devido a uma interação direta de NM com o material genético das células ou pode ser uma genotoxicidade indireta devido à geração de estresse oxidativo que, por sua vez, induzirá dano oxidativo ao material genético (COHIGNAC *et al.*, 2014).

Quando as NP são introduzidas no ambiente fisiológico, elas são rapidamente revestidas com uma camada de proteínas, conhecida como proteína corona. Vários estudos *in vitro* têm demonstrado que a proteína "corona" pode influenciar a absorção por células e alterar a citotoxicidade (FANIZZA *et al.*, 2015). No organismo, as NP interagem instantaneamente com as biomoléculas que estão presentes nos fluidos biológicos, levando à formação de um revestimento em torno da superfície das mesmas, devido à alta energia livre que possuem

(WOLFRAM *et al.*, 2014 a). Esse revestimento consiste em uma camada macia e outra rígida (Figura 3). A camada rígida está fortemente associada à NP, enquanto a camada macia é mais dinâmica (ZHU *et al.*, 2013; MONOPOLI *et al.*, 2012; ROBSON *et al.*, 2016).

Dessa forma, a presença de uma proteína corona pode alterar drasticamente as propriedades das NP, como forma, tamanho e carga (MONOPOLI *et al.*, 2012). Por exemplo, as interações proteicas podem aumentar ou diminuir o tamanho delas, e geralmente fazem com que o potencial zeta se torne mais negativo (TENZER, 2013). Além das mudanças nas características das NP, as biomoléculas endógenas que estão expostas à interface também podem sofrer alterações estruturais e funcionais. Tais mudanças podem ter implicações importantes para a segurança das mesmas (PELAZ, 2013; ZUO, 2013; WOLFRAM, 2014 a).

Fig. 3 – Representação esquemática da Proteína corona. A corona rígida consiste em uma camada de biomoléculas estreitamente associadas, enquanto a corona macia consiste em biomoléculas vagamente associadas.



Fonte: WOLFRAM *et al.*, 2014 a.

Embora a proteína corona possa dar origem a estruturas de proteínas anormais, a toxicidade das NP geralmente diminui na presença de uma camada de proteína (GE, 2011; WANG, 2013; WOLFRAM, 2014 a). À medida que a densidade da camada de proteína aumenta, a toxicidade diminui (GE, 2011). Uma explicação para este efeito protetor é que as nanopartículas revestidas têm menor afinidade para as proteínas da membrana, preservando assim a integridade da membrana celular (GE, 2011; LESNIAK, 2012; WOLFRAM, 2014 a).

Apesar da proteína corona diminuir a toxicidade de NP, gerando um efeito protetor para as células, elas também podem prejudicar a biodisponibilidade das mesmas na corrente sanguínea. Esse processo, denominado opsonização é formado por uma classe de proteínas plasmáticas chamadas opsoninas, que tornam as NP mais visíveis ao sistema imune, facilitando sua fagocitose, destruição e eliminação da corrente sanguínea.

A funcionalização dessas nanoestruturas com polímeros sintéticos hidrofílicos ou naturais têm se mostrado uma das formas mais eficientes para evitar ou diminuir esse processo de opsonização. O polietilenoglicol (PEG) é um polímero muito usado para impedir esse fenômeno, pois cria uma barreira que bloqueia a adesão das opsoninas às nanopartículas, aumentando seu tempo de permanência dentro do organismo (OWENS; PEPPAS, 2006; YANG *et al.*, 2008; BOTTINI *et al.*, 2011).

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos tóxicos de nanotubos de carbono de paredes múltiplas, funcionalizados com polietilenoglicol modificado com pireno (MWNT-PyPEG), em linhagem celular de fibroblasto de pulmão de hamster (V79-4).

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito citotóxico de MWNT-PyPEG na linhagem celular V79-4 por meio do ensaio colorimétrico MTT e do ensaio fluorométrico *CellTiter-Blue*®;
- Avaliar a capacidade de MWNT-PyPEG em induzir danos no DNA da linhagem celular V79-4, através do ensaio citogenético cometa.
- Avaliar os efeitos mutagênicos de MWNT-PyPEG no DNA da linhagem celular V79-4, através do ensaio citogenético de micronúcleo com bloqueio de citocinese citoma (CBMN – Cyt) com (+S9) e sem (-S9) ativação metabólica

3 Artigo

Nota explicativa

Conforme orientações do programa de Pós Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas, a dissertação de mestrado deve conter um artigo técnico-científico a ser submetido em revista indexada no formato e com as normas a serem submetidas.

Artigo a ser submetido para publicação na revista Nanotoxicology (fator de impacto/2018: 5.97) intitulado:

“*In vitro* safety evaluation of multi-walled carbon nanotubes funcionalized with polyethylene glycol in hamster lung fibroblast (v79-4)”

Normas:

<https://www.tandfonline.com/action/authorSubmission?show=instructions&journalCode=inan20>

IN VITRO SAFETY EVALUATION OF MULTI-WALLED CARBON NANOTUBES FUNCTIONALIZED WITH POLYETHYLENE GLYCOL IN HAMSTER LUNG FIBROBLAST (V79-4)

DANTAS, G.P.F¹; GOMIDES, L.²; GOMES, J. B.; CHEQUER, F. M. D.³; SANTOS, A.P.²; MARTINS, E.N.²; TAGLIATI, C. A.¹.

¹Toxicology in vitro Laboratory, Department of Clinical and Toxicological Analysis, School of Pharmacy- Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

²Laboratory of Carbon Nanostructures Chemistry, National Commission for Nuclear Energy - Nuclear Technology Development Center- Belo Horizonte, Brazil.

³Federal University of São João del Rei, Campus Dona Lindu Centro Oeste (UFSJ-CCO). Divinópolis, Brazil

Abstract

Carbon nanotubes (CNT) comprise an important class of materials with excellent physicochemical properties, which have received great attention in biological applications. Conflicting data regarding their cytotoxic effects have been reported. This discrepancy is due to the lack of methodologies standardization, which should take into account not only the dose and time of exposure to the agent, a parameter well established in classical toxicology, but also the intrinsic characteristics of the CNT and their behavior at the interface with the system biological. Thus, despite the large amount of data generated in the last 10 years, on the toxicity of these nanomaterials, nanotoxicology is still a great challenge. The objective of this study was to evaluate the cytotoxic, genotoxic and mutagenic potential of multi walled carbon nanotubes, functionalized with polyethylene glycol modified with pyrene (MWNT- PyPEG), after exposure of the hamster lung fibroblast cell line (V79-4). The research was conducted using the MTT and Cell Titer Blue methods to estimate cell viability and by means of the CBMN-Cyt with (+S9) or without (-S9) metabolic activation tests and comet assay to evaluate the mutagenicity and genotoxicity. The MTT method, in the range of concentrations tested (1.2 to 18.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$), showed a significant decrease in the cellular viability of cells treated with MWNT- PyPEG at the concentration of 18.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ in relation to the control group ($P < 0.05$) at different times (24, 48 and 72 h). Pyrene-PEG and other concentrations showed no change in cell viability compared to the control group. The concentration of 18.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ was cytotoxic, since cell viability was below 50% inhibitory concentration (IC_{50}). A dose-response effect was observed when MWNT- PyPEG concentrations were used between 9.25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and 18.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The CellTiterBlue® assay performed under the same conditions above, and only within 24 h, confirmed the MTT results. Results obtained with the CBMN-Cyt (-S9) and comet assay did not demonstrate genotoxicity and mutagenicity in the concentrations tested. However, when the MWNT- PyPEG were subjected to the CBMN-Cyt (+S9) assay, the number of micronucleus increased significantly over the negative control, and was similar to the positive control. Therefore, the biotransformation process of these NPs must be carefully investigated, since this system can potentiate their interaction with the genetic material, promoting mutations and consequently leading to the process of carcinogenesis. These results show the need and importance of more than one genotoxicity test to evaluate the safety of each compound.

Keywords: Nanotoxicology. Multi-walled carbon nanotubes. Polyethylene glycol. Cell viability. Genotoxicity. Mutagenicity. V79-4.

1 Introduction

The development of nanomaterials (NM) for a variety of technological applications has grown greatly in recent decades and their potential use in biomedicine has presented promising alternatives for the treatment and diagnosis of diseases, particularly for cancer (MAURER-JONES & HAYNES, 2012). However, increasing their use in society has raised concerns inherent their toxicological effects on human health and the environment (COSTA & FADEEL, 2016). Understanding the risk factors associated with exposure to nanomaterials requires the expansion of accurate and predictive approaches to their assessment, i.e. a detailed coverage of the way substances alter biological systems and lead to adverse outcomes (STURLA *et al.*, 2014; COSTA & FADEEL, 2016).

In this context, the rapid advancement of nanotechnology has also driven regulatory activities designed to maximize the benefits of products containing NMs, thereby minimizing their health risks. In addition, due to the ethical issues surrounding animal studies, the difficulties inherent in an adequate experimental design and the high cost of *in vivo* evaluations, regulatory agencies have stimulated the development of *in vitro* tests (alternative methods) using different lineages of cells of animal and human origin (DANESHIAN *et al.*, 2011; RICCARDI *et al.*, 2015).

Numerous toxicity studies have been performed with NM, but to date they have not resulted in the creation of a set of rules or methodologies applicable to many new products under development for biomedical applications (LAURENT, 2012). Variations in the intrinsic properties of NM (size, shape, surface area, functionalization, dispersion characteristics, agglomeration aspects, concentration and the medium in which they are dispersed), as well as differences in experimental conditions (treatment time, cell culture and specific experimental protocol for NM manipulation and dispersion) contribute to the existence of a substantial heterogeneity of published data (THONGKAM *et al.*, 2017, CIMBALUK *et al.*, 2018). In addition, the toxic effect of nanoparticles is highly dependent on the organs, and more specifically the cell type, due to variation in cellular (e.g., epithelial or lymphoid) physiology, proliferation state (tumor or normal cells), membrane characteristics and phagocytic characteristics among different cell types (KONG *et al.*, 2011). Therefore, nanotoxicology is still a new science that is currently establishing standard protocols and characterization methods capable of dealing with the peculiarities of nanostructures (DAVEY *et al.*, 2007).

Thus, the present study aimed to evaluate *in vitro* the cytotoxic, genotoxic and mutagenic potential of multi-walled carbon nanotubes, functionalized with polyethylene glycol modified with pyrene, after exposure of the (V79-4) hamster lung fibroblast cell line. This type of cell has interesting properties for toxicology tests, such as easy cultivation and maintenance, rapid growth and short adaptation period. In addition, they have a low frequency of mutation (ROSA, 2008). The study was conducted through alternative methods recommended by regulatory agencies, such as tests to assess cell viability through MTT and Cell Titer blue, DNA damage from the comet assay, and mutations in DNA through the micronucleus block cytokinesis test - CBMN-Cyt cytome, with (+S9) or without (-S9) metabolic activation. The use of CBMN (+S9) is important due to the fact that some line used *in vitro* tests do not present the capacity to metabolize xenobiotic compounds, and there is often a need to add exogenous systems to perform this function, for example, the S9 fraction, which makes it possible to mimic the endogenous conditions of the human organism.

2 Materials and methods

2.1 Multi-Walled Carbon Nanotubes (MWNT)

Samples of multi-walled carbon nanotubes (MWNT 3100) were obtained by Nanocyl SA (Sambreville, Belgium), lot 081219. They were purified, characterized, functionalized non-covalently with pyrene-peg and dispersed in deionized water by the Laboratory of Carbon Nanostructures, from the Center for the Development of Nuclear Technology (CDTN). The dispersion with final concentration of 0.037 mg/mL was diluted in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) high glucose containing 1mM sodium pyruvate (Gibco, USA) medium, 10% Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco, USA) and 1% (v/v) of antibiotic antimycotic solution stabilized 100x (Sigma–Aldrich, USA), to obtain the following concentrations: 1.2, 2.3, 4.7, 9.25 and 18.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Subsequently, the concentrations of 12.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and 15.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ were also used.

2.2 Cell Culture

The V79-4 cell line (Chinese hamster lung fibroblast) obtained from the National Institute of Metrology, Quality and Technology (INMETRO) was cultivated with Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) high glucose containing 1mM sodium pyruvate (Gibco, USA),

supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco, USA) and 1% (v/v) of antibiotic antimycotic solution stabilized 100x (Sigma–Aldrich, USA) in flasks with 75 cm², incubated at 37 °C in humidified atmosphere with 5% CO₂. After reaching the confluence of approximately 80%, the cells were treated with 0.025% trypsin to be released from the bottle. After centrifugation and counting in Neubauer's chamber, they were submitted to cytotoxicity and genotoxicity assays.

2.3 Cell viability

Cell viability and proliferation were assessed by performing the MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) colorimetric and CellTiter-Blue® fluorimetric viability method, according to the manufacturer's directions. First, V79-4 cells were seeded at 2500 and 5000 cells per well in 96-well flat-bottom plates (Kasvi, Curitiba, Brazil) for the MTT and CellTiter-Blue® assay, respectively. After 24h of incubation at 37 °C with an atmosphere of 5% CO₂ / 95% air, the cells were exposed to different concentrations of MWNT- PyPEG (1.2, 2.3, 4.7, 9.25 and 18.5 µg mL⁻¹) for 24, 48 and 72 h. Next, MTT (Sigma-Aldrich, USA) was added at 0.5 mg mL⁻¹. The cells were allowed to react for 3 h in dark at 37 °C. After that, MTT was removed and 100 µL of dimethylsulfoxide (DMSO) was added to each well to dissolve crystals. Absorbance signal (570 nm) was measured in a microplate reader (Molecular Devices SPECTRA Max PLUS 384). Non-stimulated V79-4 cells were cultured as metabolically viable cell control. Background fluorescence was corrected by including control wells to each plate to measure the fluorescence signal from the serum-supplemented culture medium in the absence of cells. Additionally, interference in the fluorescence signal was measured in the culture media supplemented with serum stimulated with MWCNTs at different concentrations (Figure. S1). The same procedure was performed for the CellTiter-Blue reagent assay. After 24 hours of cell exposure to MWNT- PyPEG at different concentration, CellTiter-Blue® viability reagent was added to the cells already cultured in 200 µL of DEMEM medium / well (1:10 final dilution). The cells were allowed to react for 3 h in the dark at 37 °C and the fluorescence (560 nm (ex) / 590 nm (em)) signals were measured in a microplate reader (Varioskan Flash, Thermo Fisher Scientific, US). All tests were performed at least three times, producing a full agreement among the results. The fraction of surviving cells in treated groups was calculated as a percentage of the control group, while the fluorescence in the control was considered 100% survival.

2.4 Comet assay

The alkaline comet assay (i.e., single-cell gel electrophoresis assay) was performed according to the methods described by Singh *et al.*, (1988) and Tice *et al.*, (2000). To evaluate DNA damage, V79-4 cells were seeded at 100000 cells per well in 24-well plates at 37 °C with 5% CO₂ for 24 h. After that, the cells were exposed to MWNT- PyPEG at different concentrations (1.2, 2.3, 4.7 and 9.25 µg mL⁻¹). Following, V79-4 cells were cultured a further 24 h at 37 °C with an atmosphere of 5% CO₂ / 95% air and cells were collected and centrifuged at 212 g for 5 min. As a positive control, methyl methane sulfonate (MMS) was used for micronuclei induction at 25 µg mL⁻¹. Sample vehicle (deionized water) was used as a negative control.

For slide preparation, cell suspension of each treatment was first mixed with low melting point agarose (LMP) and, then, 50 µL of the prepared solution was spread onto the slides, previously covered with 1.5% normal melting point agarose at a temperature around 60 °C. Next, the slides were covered with coverslips and left in the refrigerator for drying. After, the coverslips were removed and the slides were placed in the lysis solution (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris pH 10, 1% Triton X-100 and 10% DMSO) for 2 h at 4 °C. They were then removed and transferred to a electrophoresis unit filled with alkaline buffer (1 mM EDTA and 300 mM, pH ≥ 13) and incubated for 40 min to denature the DNA. Electrophoresis was conducted at 25 V and 300 mA for 25 min under ice bath. Following, the slides were neutralized three times in a neutralization solution (0.4 M Tris, pH 7.5) for 5 min, fixed with absolute ethanol and dried at room temperature. Then, the slides were stained with GelRed™ (Biotium, USA) solution (1:10.000) for three minutes. After staining, the excess was removed by washing and the slides covered with coverslips. Fluorescence signal (560 nm (ex) / 590 nm (em)) was obtained in a fluorescence microscope (40 x objective) (EVOS® Digital Microscopes). A total of 100 cells were counted for each treatment, corresponding to the concentrations tested. The data generated were analyzed using TriTek CometScore Freeware 1.6.1.13. Cell damage was characterized as zero - no damage (<5%), 1 - low damage level (5 - 20%), 2 - medium damage level (20 - 40%), 3 - high damage level 40 - 95%) and 4 - total damages (> 95%) (Figure 1). The analysis also comprised the parameters of head DNA percentage, tail DNA percentage and tail moment, (result of the multiplication of the % of DNA in the tail by the length of the tail).

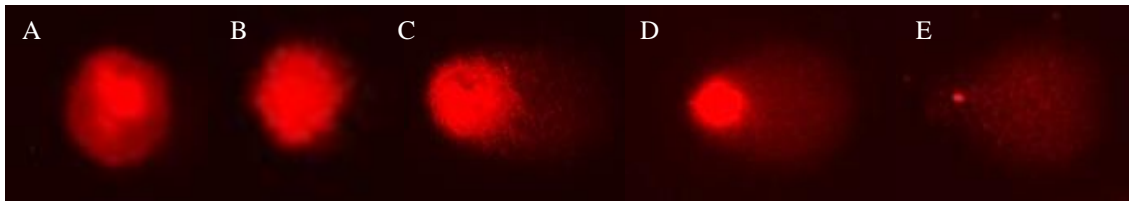


Fig 1. Parameters evaluated in the Comet assay. (A) Cell without damage – Class 0 (<5%) (B) Cell with low damage level – Class 1 (5 - 20%) (C) Cell with medium damage level - Class 2 (20 - 40%). (D) Cell with high damage level – Class 3 (40 - 95%). (E) Cell with total damages – Class 4 (> 95%). Increase of 40x, staining with Gel Red 10.000x in water.

2.5 Cytokinesis-block micronucleus cytome (CBMN-Cyt) assay

The cytokinesis-block micronucleus cytome (CBMN-Cyt) assay was used to detect the chromosomal mutations. The test is based on the microscopic detection of a chromosome or chromosome fragment of a cell that failed to integrate into the nucleus of the daughter cell after division. The assay was carried out in accordance with OECD 487 (2014), along with Fenech protocols (2007), which include two more evaluation parameters (the nucleoplasmic bridges and the nuclear bud). The CBMN-Cyt cytome test was performed with (+ S9) and without metabolic activation (-S9).

2.5.1 CBMN-Cyt assay without metabolic activation

To evaluate the formation of MN, V79-4 cells were seeded at 200000 cells per well in 6-well plates at 37 °C with 5% CO₂ for 24 h. Following, cells were exposed to MWNT- PyPEG at different concentrations (1.2, 2.3, 4.7, 9.25 and 18.5 µg mL⁻¹). After 20 h, Cytochalasin B solution at 3.0 µg/ml was added. Finally, cells were collected 72 h after MWNT- PyPEG stimulus and the hypotonic process was performed with 1% sodium citrate solution for 5 minutes. As a positive control, methyl methane sulfonate (MMS) (Sigma-Aldrich®, USA) was used for micronuclei induction at 25 µg mL⁻¹. The sample vehicle (deionized water) was used as a negative control.

For cell fixation, 20 µL of formaldehyde and methanol/acetic acid (3:1; v/v) were used and subsequently centrifuged at 212 g for 5 min. The fixation process was performed three times. All slides were prepared in triplicate and cell suspension was uniformly added to each of them.

The slides were left to dry at room temperature and then stained with acridine orange solution at $40 \mu\text{g mL}^{-1}$. The fluorescence signal (450-490 nm (ex) /515 nm (em)) was measured in a fluorescence microscope (40 x objective) (EVOS® Digital Microscopes). From each treatment, 2000 binucleated cells were counted with 0, 1, 2, 3 or more MNs, nucleoplasmic bridges (NPBs) and nuclear buds (NBUDs), according to Fenech, 2007 (Figure 2). In addition, 500 viable cells were counted among mononuclear, binucleate and multinucleate (three or more nuclei) cells. The cytokinesis-block proliferation index (CBPI) and the replication index (RI) were calculated to estimate cell proliferation and the relative number of cell cycles per cell during the period of cytochalasin B exposure in treated groups compared to the untreated group (negative control), according to the equation described by OECD 487 (2014):

$$\text{CBPI} = \frac{((\text{No. mononucleate cells}) + (2 \times \text{No. binucleate cells}) + (3 \times \text{No. multinucleate cells}))}{(\text{Total number of cells})}$$

$$\text{RI} = \frac{((\text{No. binucleate cells}) + (2 \times \text{No. multinucleate cells})) \div (\text{Total number of cells})\text{T}}{((\text{No. binucleate cells}) + (2 \times \text{No. multinucleate cells})) \div (\text{Total number of cells})\text{C}} \times 100$$

2.5.2 CBMN-Cyt assay with metabolic activation

For this experiment, V79-4 cells were seeded at 200000 cells per well in 6-well plates at 37°C with 5% CO_2 for 24 h. Following, cells were exposed to MWNT- PyPEG at different concentrations (1.2, 2.3, 4.7, 9.25 and $18.5 \mu\text{g mL}^{-1}$) for 24 h. After incubation time, $120 \mu\text{L}$ / well of S9 mix (1 mL distilled water, 1.75 mL PBS (pH 7.4), $100 \mu\text{L}$ NADP (76.5 mg mL^{-1}), $25 \mu\text{L}$ glucose 6-phosphate ($282, 1 \text{ mg mL}^{-1}$), $25 \mu\text{L}$ KCl (1.65 M), $25 \mu\text{L}$ MgCl_2 (0.4 M) and $100 \mu\text{L}$ S9 (rat liver enzyme mixture) (Sigma-Aldrich®, USA)) was added. V79-4 cells were cultured a further 24 h at 37°C with an atmosphere of 5% CO_2 / 95% air. Finally, cells were collected and the following steps were performed according to item 4.2.1. As a positive control, cyclophosphamide ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) was used. Sample vehicle (deionized water) without S9 mix was used as a negative control.

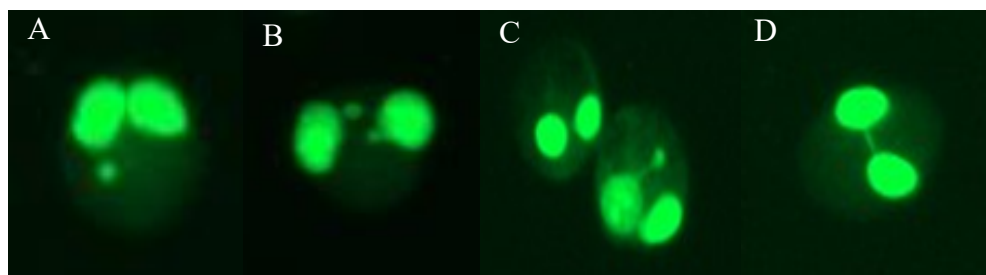


Fig 2. Parameters evaluated in the CBMN-Cyt assay. (A) Binucleate cell with a micronucleus. (B) Binucleate cell with two or more micronuclei. (C) Binucleate cell with nuclear bud. (D) Binucleate cell nucleoplasmic bridge. Increase of 40x, staining with acridine orange $40 \mu\text{g mL}^{-1}$.

2.6 Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm standard error of three independent experiments ($p < 0.05$). Statistical evaluation of the data was performed using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey post-test in GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, USA).

3 Results and Discussion

3.1 Cell viability

In our study, MTT colorimetric and CellTiter-Blue® fluorométrico viability method were used to evaluate cytotoxicity in V79-4 cell line exposed to MWNT- PyPEG at different concentrations. The use of two methods to evaluate cell viability of nanoparticles was suggested due to several reports in the literature about their interference with some reagents of the cytotoxicity assays (MONTEIRO-RIVIERE *et al*, 2009).

Fig. 3A, B and C shows the viability and proliferation results of V79-4 cell line exposed to PyPEG and MWNT- PyPEG at different concentrations using MTT method. No significant reduction of cell viability, in relation to the control group, was observed after exposition at different times (24, 48 and 72 h) to PyPEG at $18.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ and MWNT- PyPEG at 1.2, 2.3, 4.7 and $9.25 \mu\text{g mL}^{-1}$. The only concentration that proved to be significantly cytotoxic for this cell line was $18.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($*p < 0.05$), as it decreased cell viability to percentages below the 50% inhibitory concentration (IC_{50}).

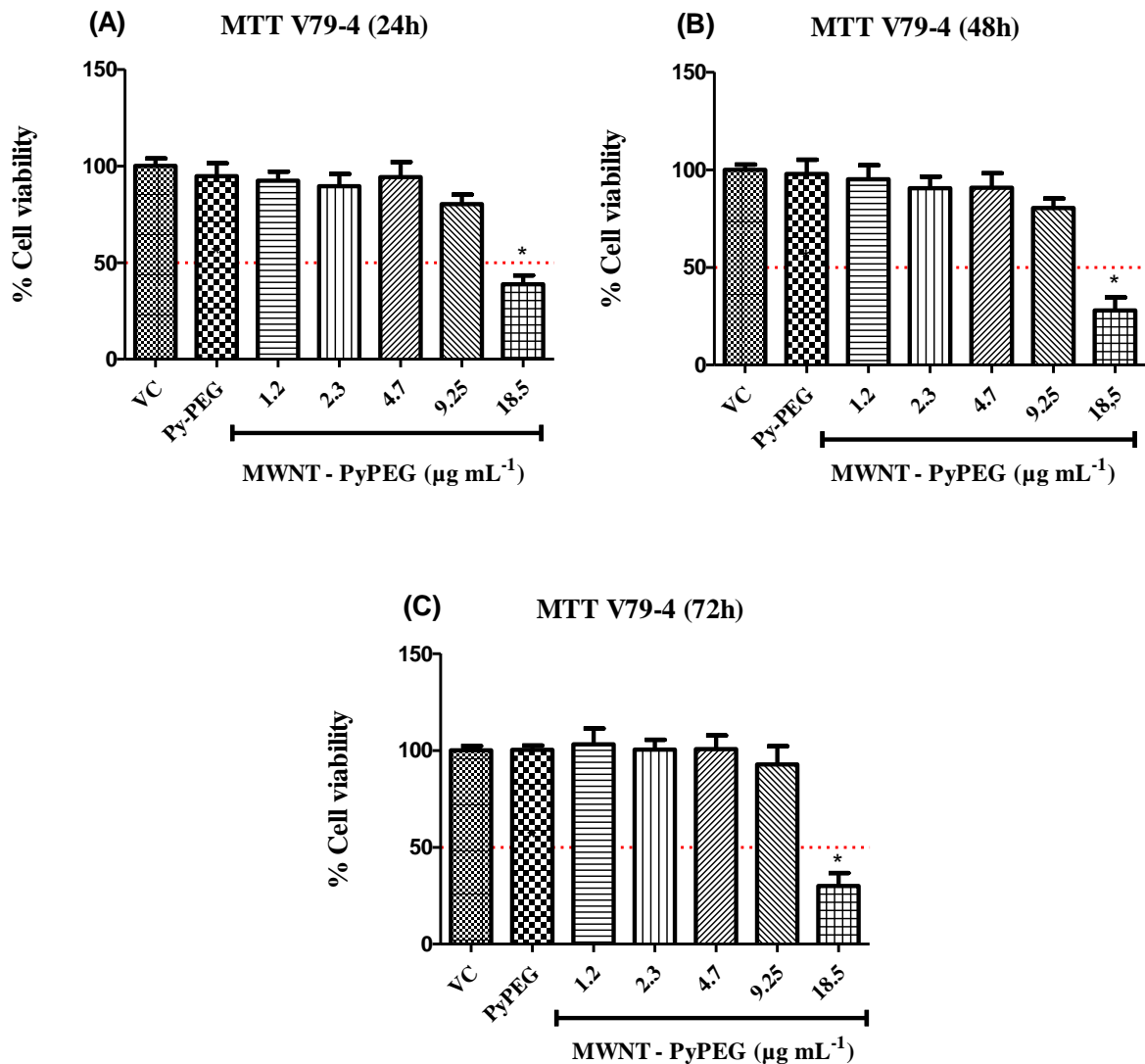


Fig 3. Cell viability evaluation using MTT method. A) V79-4 cells exposed to PyPEG and MWNT-PyPEG for 24 h. B) V79-4 cells exposed to PyPEG and MWNT-PyPEG for 48 h. C) V79-4 cells exposed to PyPEG and MWNT-PyPEG for 72 h. The experiments were performed in triplicate; non treated cells were used as controls (VC); Pyrene-PEG (PyPEG) was used at $18.5 \mu\text{g mL}^{-1}$. The fraction of surviving cells in treated groups was calculated as a percentage of the control group, while the absorbance in the control was considered 100% survival. Data represent the mean \pm standard deviation of three determinations (SD; $n=6$) (* $p < 0.05$ significantly different from the control group).

The CellTiterBlue® assay was carried out 24 h post stimulus because no significant difference in the viability and proliferation of cells exposed to PyPEG and MWNT-PyPEG was observed at different times (24, 48 e 72 hours). The results corroborated the MTT viability results described above, highlighting once again IC_{50} reduction to $18.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ (* $p < 0.05$) (Figure 4).

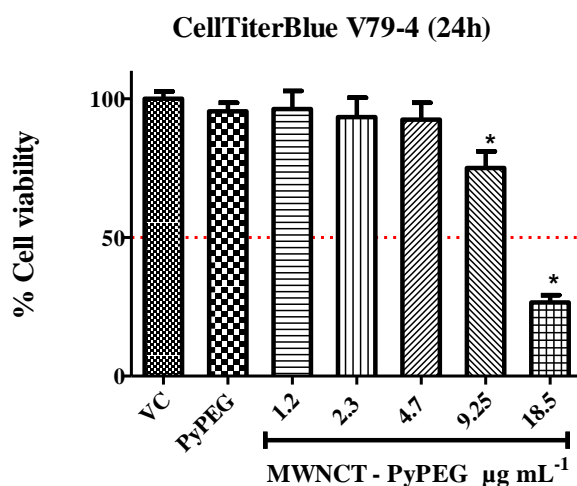


Fig 4. Cell viability evaluation using CellTiterBlue assay. The V79-4 cells were exposed to PyPEG and MWNT-PyPEG for 24 h. The experiments were performed in triplicate; non treated cells were used as controls (VC); Pyrene-PEG (PyPEG) was used at $18.5 \mu\text{g mL}^{-1}$. The fraction of surviving cells in treated groups was calculated as a percentage of the control group, while the fluorescence in the control was considered 100% survival. Data represent the mean \pm standard deviation of three determinations (SD; $n=6$) (* $p < 0.05$ significantly different from the control group).

As the dose response curve of both MTT and CellTiterBlue® indicated cell viability reduction at concentration between 9.25 and $18.5 \mu\text{g mL}^{-1}$, another MTT assay was performed, adding the 12.5 and $15.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ concentrations. The results showed a significant decrease in cell viability in a concentration-dependent manner. No cell viability changes were observed for PyPEG at $18.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Figure 5).

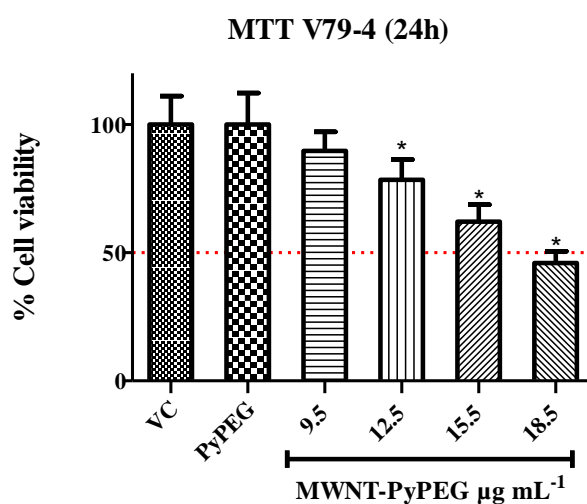


Fig 5. Cell viability evaluation using the MTT with concentration range between $9.25 \mu\text{g/mL}$ - $18.5 \mu\text{g/mL}$ for 24h. The V79-4 cells were exposed to PyPEG and MWNT-PyPEG for 24 h. The experiments were performed in triplicate; non treated cells were used as controls (VC); Pyrene-PEG (PyPEG) was used at $18.5 \mu\text{g mL}^{-1}$. The

fraction of surviving cells in treated groups was calculated as a percentage of the control group, while the absorbance in the control was considered 100% survival. Data represent the mean \pm standard deviation of three determinations (SD; n=6) (* $p < 0.05$ significantly different from the control group).

Summarizing, the results showed that the cells exposed to MWNT- PyPEG at concentration between 1.2, 2.3, 4.7 and 9.25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ did not induce significant cytotoxicity when analyzed with both MTT and CellTiterBlue methods. The percentage of viable cells was up to 90 % for the concentrations below 9.25 $\mu\text{g mL}^{-1}$, regardless the exposure time. Concentrations above this value (9.25 to 18.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) showed a concentration-dependent response profile. Our results are in accordance with those obtained by Alarifi *et al.* (2015) and Darne *et al.* (2014), which also showed a slight dose-dependent cytotoxicity at different cell lines exposed to MWNT at high concentrations.

The concentration of the particles that effectively come into contact with the cells in the cytotoxicity assays may vary widely depending on the stability and the aggregation state of the NPs in the medium. In contrast to soluble chemicals, nanoparticles at high concentrations or unstable systems tend to agglomerate when dispersed in the culture media. Therefore, traditional assays to measure the effect of nanoparticles often do not represent a real scenario. The exact transportation rate of nanoparticles to adherent cells on the culture plate may be affected. As a result, defining the dose for *in vitro* study is rather complicated (TEEGUARDEN, *et al.*, 2007; KONG *et al.*, 2011). In this study, this relationship between dose (concentration) and biological response was evidenced due to the functionalization of the MWNT with pyrene PEG (MWNT-PyPEG). MWNT-PyPEG has showed to be well dispersed in culture medium, without any NP aggregation (data not shown). As well established in the literature, pegylation has been a good strategy due to its capacity to increase hydrophilicity of MWNT in aqueous medium, thus contributing to the increase of its stability, biocompatibility and bioavailability, with consequent low cytotoxicity (OWENS; PEPPAS, 2006; ANDERSEN, 2009; GAMUCCI *et al.*, 2014).

3.2 Comet assay

The results obtained with comet assay are shown in Figure 6 (A and B) and in Table 1. We can observe that there was no significant genotoxic damage at all concentrations tested in relation to the negative and positive controls. A significant difference ($p < 0.05$) in the percentage of

DNA in tail (Figure 6A) and tail moment (Figure B) in relation to the negative control was observed only in the cells treated with PyPEG at 18.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

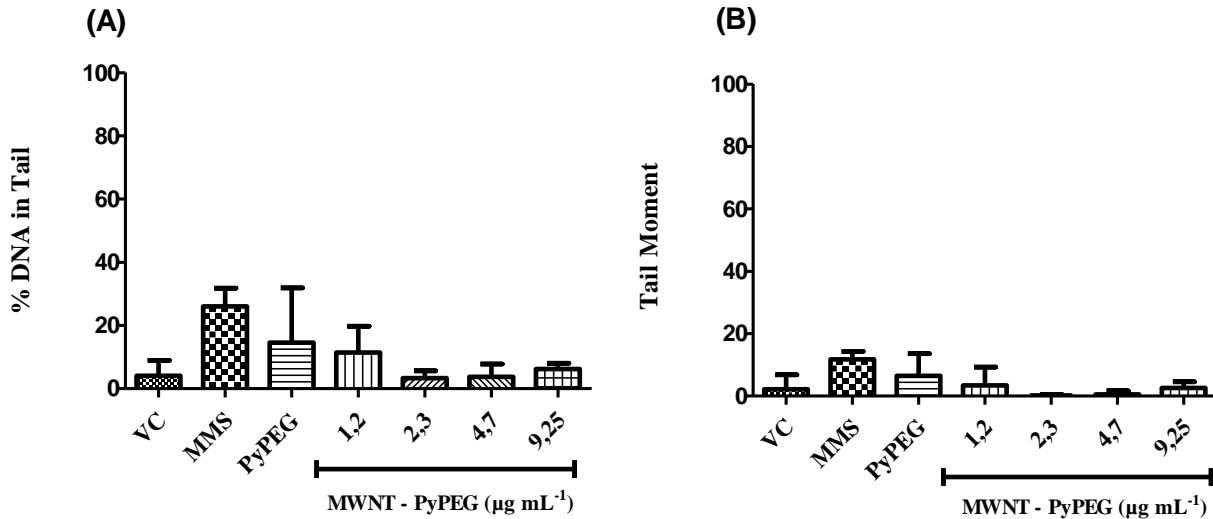


Fig 6. Genotoxicity evaluation of MWNT- PyPEG on V79-4 cells for 24 h using comet assay. A) % DNA in tail. B) Tail moment. The experiments were performed in triplicate; vehicle control: deionized water; positive control: MMS (Methyl Methane Sulfonate); Pyrene-PEG (PyPEG) was used at 18.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$; (* $p < 0.05$ significantly different from the negative control).

Table 1 shows the means and standard deviation of % DNA in the comet head and the tail and tail moment as well as the class of damage elicited in V79-4 cell line exposed to MWNT-PyPEG and PyPEG. The % DNA in the comet head was greater than 90% in all concentrations tested, except for the concentration of 1.2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (88.75%) and pyrene-peg at 18.5- $\mu\text{g mL}^{-1}$ (85.54%). Tail moment was well below MMS in all concentrations tested. In addition, the highest class of damage observed was 1 (5-20%).

Table 1: Genotoxicity assessment of MWNT-PyPEG on V79-4 cells using the comet assay.

<i>Comet assay</i>				
Treatment ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	%DNA in Head	%DNA in Tail	Tail Moment	Class of damage
<i>Vehicle Control</i>	97.62 ± 0.68	4.11 ± 1.97	2.16 ± 1.86	1
<i>MMS</i>	74.00 ± 2.33	26.00 ± 2.33	11.71 ± 1.06	2
<i>PyPEG</i>	85.54 ± 7.05	14.53 ± 6.99	6.49 ± 2.86	1
<i>9.25</i>	96.37 ± 1.06	6.22 ± 0.73	2.64 ± 0.78	1
<i>4.7</i>	96.23 ± 1.59	3.71 ± 1.66	0.58 ± 0.44	0
<i>2.3</i>	96.64 ± 0.94	3.35 ± 0.94	0.24 ± 0.11	0
<i>1.2</i>	88.75 ± 3.55	11.47 ± 3.33	3.43 ± 2.35	1

Values shown represent the mean \pm SD; Vehicle control: DMEM and deionized water; MMS: Methyl Methane Sulfonate. The data shown are based on three independent experiments.

*: Significantly different from the negative control group ($p < 0.05$).

Our results were different when compared to results reported in the literature. None of the MWNT-PyPEG concentrations tested in V79-4 line provoked a high DNA damage index. However, Ghosh *et al.* (2011) showed through the alkaline comet assay a reduction in the DNA migration of human lymphocytes exposed to MWNT at 5 and 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, and attributed these findings to the occurrence of CNT-DNA crosslinks. Other studies demonstrated discrepant results regarding the toxicity caused by the carbon nanostructure depending on the concentration used, exposure time and functionalization process. The studies comparing the cyto-genotoxicity of functionalized and pure MWNT in A549 cells showed a slight increase in DNA damage, concentration-dependent, when exposed to pure MWNT after 2 to 4 hours, with a more evident increase after 24 hours (URSINE *et al.*, 2012). The NM effects may also vary substantially depending on the cell line type. Lindberg *et al.* (2013) evaluated the genotoxicity of SWNT and MWNT at concentrations 20, 40, 60 e 80 $\mu\text{g /cm}^2$ in human bronchial epithelial cells (BEAS 2B) and mesothelial (MeT-5A) through the comet assay. No increase in DNA damage index in BEAS 2B cells exposed to both SWNT and MWNT for 24 and 48 hours was observed. Nevertheless, MeT-5A mesothelial cells presented a significant increase in DNA damage, depending on time and treatments. Recently, Thongkam *et al.* (2017) investigated *in vitro* both the genotoxicity and cytotoxicity of a batch of NM in three human epithelial cell lines: A549, HK-2 and HepG2. The two MWNTs samples evaluated through the comet assay at 1, 10 e 100 $\mu\text{g /cm}^2$ did not cause any remarkable DNA damage in the three cell lines analyzed. In this way, genotoxicity assessment of NP by comet assay seems to be very

controversial and related to several factors such as differences in NM properties as well as variations of experimental conditions. Thus, the use of two or more genotoxicity assays becomes extremely necessary so that no false-positive or false-negative results occur.

3.3 CBMN-Cyt assay without metabolic activation

According to the results described in Table 2, it can be observed that there was no significant increase in MN induction in the V79-4 line exposed to different concentrations of MWNT-PyPEG (1.2, 2.3, 4.7 e 9.25 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and to the PyPEG (18.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) in relation to the negative control group. The positive control MMS (25 $\mu\text{g mL}^{-1}$), as expected, resulted in a higher frequency of MN ($p < 0.05$) in relation to the negative control and MWNT-PyPEG groups. Pyrene-PEG presented an MN induction similar to the concentration of 2.3 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Regarding the frequency of NBUDs and NPBs (also shown in Table 1), no significant difference was also observed in the number of NPBS between the experimental and control groups. In addition, all concentrations of MWNT-PyPEG had CBPI above 2 and RI greater than 100% (except at 9.25 $\mu\text{g mL}^{-1}$), confirming absence cytotoxicity.

Table 2: Mutagenic effects assessment of MWNT- PyPEG on V79-4 cells using the cytokinesis-block micronucleus cytochrome assay (CBMN-Cyt) without metabolic activation.

Treatment ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CBMN-Cyt			CBPI	RI %
	Total n°. in 2000 BN cells				
	MN	NBUDs	NPBs		
<i>Vehicle Control</i>	13.333 \pm 8.50	3.33 \pm 4.16	0.67 \pm 1.15	2.28 \pm 0.07	100.00
<i>MMS</i>	182.00 \pm 46.89	11.00 \pm 13.07	5.00 \pm 3.60	2.08 \pm 0.06	84.79
<i>Pyrene-PEG</i>	14.00 \pm 7.55	1.33 \pm 1.15	0.67 \pm 0.58	2.43 \pm 0.08	112.43
<i>9.25</i>	26.66 \pm 8.50	2.67 \pm 1.53	1.00 \pm 0.00	2.27 \pm 0.18	99.73
<i>4.7</i>	19.33 \pm 8.96	3.33 \pm 1.53	0.33 \pm 0.58	2.36 \pm 0.03	107.05
<i>2.3</i>	14.33 \pm 0.58	1.33 \pm 0.58	0.00 \pm 0.00	2.33 \pm 0.14	104.55
<i>1.2</i>	12.00 \pm 9.54	0.33 \pm 0.58	0.33 \pm 0.58	2.34 \pm 0.18	105.02

Values shown represent the mean \pm SD; BN: binucleated cell; MN: micronuclei; NPBs: nucleoplasmic bridges; NBUDs: nuclear buds; CBPI: Cytokinesis-Block Proliferation Index; RI: Replication Index; Vehicle control: water; MMS: Methyl methanesulfonate 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The data shown are based on three independent experiments. *: Significantly different from the negative control group ($p < 0.05$).

The results demonstrated that MWNT-PyPEG was not able to promote significant mutagenicity in the V79-4 line at all concentrations tested. Regarding the replication index, both the MMS and the MWNT-PyPEG concentrations tested were below the range considered to be cytotoxic by OECD 487 (2014), which determines that cytotoxicity indices greater than $50 \pm 5\%$ may induce chromosomal damage. Our results are in accordance with Szendi & Vargas (2008), which demonstrated that human blood sample exposure to MWNT, did not affect binucleate cells frequency, reflecting the lack of cytotoxic effects, nor any significant statistical differences were found in MN induction between the samples tested and the negative control.

Asakura *et al.* (2010) also evaluated the cytotoxicity and mutagenicity of MWNT at concentrations of 0.02, 0.078, 0.31, 1.3 and $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ in CHL/IU Chinese hamster lung cells and found results that corroborate with those obtained in our study. MWNT did not produce a significant increase in the induction of micronuclei in comparison to the negative control and produced a dose-dependent effect, similar to our results.

In another study, carried out by PONTI *et al.* (2012) which evaluated the cytotoxicity, morphological transformation and genotoxicity of Balb/3T3 mouse fibroblast cells as a function of exposure to MWNT with different types of functionalization (nude, -OH, -COOH and -NH₂) at 1, 10 and $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, no significant results were obtained in the mutagenic induction at all concentrations tested, corroborating with also our results.

These findings suggest that MWNT-PyPEG may not present toxicity *in vitro*. However, in other studies carried out by several authors, at different concentrations, it was observed that the NTC present cytotoxic, genotoxic and carcinogenic effects (SHARMA *et al.*, 2007; ZENI *et al.*, 2008; SARGENT *et al.*, 2009; PATLOLLA *et al.*, 2010; KATO *et al.*, 2013; SIEGRIST *et al.*, 2014). Thus, the CBMN-Cyt assay with metabolic activation was performed with the purpose of elucidating a possible involvement of the metabolism process of MWNT-PyPEG or not with its toxicity. Furthermore, the micronucleus test protocol proposed by the ECVAM and OECD 487 suggest the introduction of S9 mix during the *in vitro* experimental procedure.

3.4 CBMN-Cyt assay with metabolic activation

Regarding the results described in Table 3, we observed a significant difference in the induction of MN in the V79-4 line at the concentration of 9.25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ in relation to the negative control group. No such difference was observed in the other concentrations of MWNT-PyPEG (1.2, 2.3, 4.7 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and Py-PEG (18.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$). The positive control Cyclo (10 $\mu\text{g mL}^{-1}$), as expected, resulted in a higher frequency of MN ($p < 0.05$) in relation to the negative control group and only at concentrations 1.2 and 2.3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of MWNT-PyPEG. A dose-response effect can also be observed, but not very significant, especially at the lower concentrations.

The frequency of NBUDS and NPBS is shown in Table 3. There was significant difference only in the frequency of NBUDS in cells exposed to Cyclo and the concentration of 1.2 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Regarding the frequency of NPBS, no significant difference was observed in the number of NPBS in the experimental groups or in the control groups. In this experiment, all concentrations of MWNT-PyPEG presented CBPI levels above 2, IR greater than 90%, confirming the absence of cytotoxicity of the concentrations tested, and there was no significant difference related to these parameters.

Table 3: Mutagenic effects assessment of MWNT- PyPEG on V79-4 cells using the cytokinesis-block micronucleus cytome assay (CBMN-Cyt) with metabolic activation.

Treatment ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CBMN-Cyt			CBPI	RI %
	Total n°. in 2000 BN cells				
	MN	NBUDs	NPBs		
<i>Vehicle control</i>	50.00 \pm 6,24	3.00 \pm 3.00	0.33 \pm 0.58	2.09 \pm 0.06	100
<i>Cyclo</i>	194.00 \pm 30,51*	6.00 \pm 0.00	2.33 \pm 1.15	1.91 \pm 0.07	84.09
<i>Pyrene-PEG</i>	76.33 \pm 20,60	3.67 \pm 0.58	1.00 \pm 1.00	2.07 \pm 0.05	93.37
9.25	164.67 \pm 33,65*	3.67 \pm 1.15	2.33 \pm 2.08	2.02 \pm 0.04	94,04
4.7	115.00 \pm 30,35	3.67 \pm 0.58	0.33 \pm 0.58	2.06 \pm 0.03	97.30
2.3	110.00 \pm 28,48	3.33 \pm 2.08	0.67 \pm 1.15	2.02 \pm 0.05	94.04
1.2	110.33 \pm 21,83	1.00 \pm 1.00	0.33 \pm 0.58	2.07 \pm 0.00	99.02

Values shown represent the mean \pm SD; BN: binucleated cell; MN: micronuclei; NPBs: nucleoplasmic bridges;

NBUDs: nuclear buds; CBPI: Cytokinesis-Block Proliferation Index; RI: Replication Index; Vehicle control: water; Cyclo: Cyclophosphamide 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The data shown are based on three independent experiments.

*: Significantly different from the negative control group ($p < 0.05$).

The results obtained suggest that the MWNT- PyPEG underwent a biotransformation process through the S9 microsomal fraction, that is, they underwent a transformation process in which their activity was altered. This fact can be confirmed by the significant increase in MN induction, especially at the concentration of 9.25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ in relation to the negative control.

In studies carried out by Di Sotto *et al.* (2008), no mutagenic activity was observed in two bacterial strains (*Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*), through the Ames test in the presence of the S9 metabolic activator. Kim *et al.* (2010) evaluated and compared the genetic toxicity potential of MWNT through the Ames (bacterial reverse mutation), *in vitro* chromosome aberration and *in vitro* cytotoxicity tests, all with and without metabolic activation. However, the results obtained do not corroborate with our results, since they did not present a significant difference in the tests using S9.

Other studies have shown no significant difference in the genotoxic potential of MWNT in *in vitro* systems with bacteria in the presence of the metabolic activator (KISIN *et al.*, 2007; SZENDI and VARGA, 2008; WIRNITZER *et al.*, 2009). This study appears to be the first to report a biotransformation process of MWNT in the MN assay *in vitro* in mammalian cells. The process of biotransformation or metabolic activation, transform lipophilic molecules into more water-soluble metabolites, making them beneficial, harmful or even inefficient. Although mammalian cell lines have an enzymatic system for pro-mutagen activation, the levels of these enzymes are very low and require the addition of exogenous enzyme systems, often using the S9 mix extracted from the liver of rats (GONZALEZ *et al.*, 2011; OECD 487, 2014).

Our results compared with results of other authors (KISIN *et al.*, 2007; SZENDI and VARGA, 2008; WIRNITZER *et al.*, 2009; LINDBERG *et al.*, 2013; KATO *et al.*, 2013) show that the genotoxic properties of MWNT can vary considerably and depend on several factors, already mentioned above. These findings confirm the substantial heterogeneity of several studies performed with CNT. Moreover, several hypotheses as physicochemical properties of the sample, exposure time, and the use or not of dispersants, the biomarker employed and the species used as a model related to the direct interaction between biomolecules like protein and

DNA and the MWNT, functionalized or not, are raised and may be partially involved in inducing the genotoxicity and mutagenicity of these nanoparticles *in vitro*.

Conclusions

The present study showed that MWNT-PyPEG did not present a high cytotoxic potential in the V79-4 line. However, they presented a dose-dependent toxicity profile. In the comet assay, we did not observe excessive DNA damage. The results obtained with the CBMN-Cyt (-S9) assay did not demonstrate mutagenicity, only MN being observed at reduced levels, although superior to the negative control. However, when MWNT-PyPEG were subjected to the CBMN-Cyt (+S9) assay, the number of MN increased significantly regarding the negative control, and was similar to the positive control. Therefore, the biotransformation process of these NPs must be carefully investigated, since this system can potentiate their interaction with the genetic material, promoting more mutations and consequently leading to the process of carcinogenesis. These results show the need and importance of more than one genotoxicity test to evaluate the safety of each compound, preventing the occurrence of false-positive or false-negative results.

4 References

ALARIFI, S.; ALI, D. Mechanisms of Multi-walled Carbon Nanotubes–Induced Oxidative Stress and Genotoxicity in Mouse Fibroblast Cells. **International Journal of Toxicology**, v. 34, n. 3, p. 258-265, jun. 2015.

ANDERSEN, A.J., *et al.* Complement: Alive and kicking nanomedicines. **J. Biomed. Nanotechnology**, v. 5, p. n. 4, 364–372, aug. 2009.

ASAKURA, M. *et al.* Genotoxicity and cytotoxicity of multi-wall carbon nanotubes in cultured chinese hamster lung cells in comparison with chrysotile a fibers. **J Occup Health**, v. 52, n. 3, p. 9 –20, apr. 2010.

CIMBALUK, G. V. *et al.* Evaluation of multi-walled carbon nanotubes toxicity in two fish species. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 150, n. 1, p. 215–223, apr. 2018.

COSTA, P.M.; FADEEL, B. Emerging systems biology approaches in nanotoxicology: Towards a mechanism-based understanding of nanomaterial hazard and risk. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 299, n. 1, p. 101–111, may. 2016.

DANESHIAN *et al.* A Framework Program for the Teaching of Alternative Methods (Replacement, Reduction, Refinement) to Animal Experimentation. **Altex**, v. 28, n. 4, p. 4-11, dec. 2011.

DARNE *et al.* Cytotoxicity and Genotoxicity of Panel of Single- and Multi-walled Carbon Nanotubes: In Vitro Effects on Normal Syrian Hamster Embryo and Immortalized V79 Hamster Lung Cells. **Journal of Toxicology**, v. 2014, n. 1, p. 872195, dec. 2014.

DAVEY, G.; GEBREHANNA, E.; ADEYEMO, A. *et al.* Podoconiosis: a tropical model for 1172 gene-environment interactions? **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 101, n.1, p. 91–96, jan. 2007.

Di SOTTO, A., *et al.* Multi-walled carbon nanotubes: lack of mutagenic activity in the bacterial reverse mutation assay. **Toxicol Lett**, v. 184, n. 2, p. 192–197, feb. 2008.

GAMUCCI, O., *et al.* Biomedical Nanoparticles: Overview of Their Surface Immune-Compatibility. **Coatings**, v. 4, n. 1, p. 139-159, feb. 2014.

GHOSH, M. *et al.* Multi-walled carbon nanotubes (MWCNT): Induction of DNA damage in plant and mammalian cells. **Journal of Hazardous Materials**, v. 197, n. 1, p. 327–336, dec. 2011.

GONZALEZ, L.; SANDERSON, B.J.; KIRSCH-VOLDERS, M. - Adaptations of the *in vitro* micronuclei assay for the genotoxicity assessment of nanomaterials. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 185-191, jan. 2011.

KATO, T., *et al.* Genotoxicity of multi-walled carbon nanotubes in both in vitro and in vivo assay systems. **Nanotoxicology**, v.7, n. 4, p. 452–461, jun. 2013.

KIM, J.S. *et al.* Aspect ratio has no effect on genotoxicity of multi-wall carbon nanotubes. **Archives of Toxicology**, v.85, n. 7, p. 775-786, jul. 2010.

KISIN, E. *et al.* Single-walled carbon nanotubes: geno- and cytotoxic effects in lung fibroblast V79 cells. **Journal of Toxicology and Environmental Health A**, v. 70, n. 24, p. 2071-2079, dec. 2007.

KONG, B. *et al.* Experimental considerations on the cytotoxicity of nanoparticles. **Nanomedicine**, v. 6, n. 5, p. 929–941, jul. 2011.

LAURENT *et al.* Crucial Ignored Parameters on Nanotoxicology: The Importance of Toxicity Assay Modifications and “Cell Vision”. **PLoS ONE**, v. 7, n. 1, p. 29997, jan. 2012.

LINDBERG, H. K. *et al.* Genotoxicity of short single-wall and multi-wall carbon nanotubes in human bronchial epithelial and mesothelial cells in vitro. **Toxicology**, v. 313, n. 1, p. 24-37, dec. 2013.

MAURER-JONES, M.A., HAYNES, C.L. Toward correlation in in vivo and in vitro Nanotoxicology Studies. **Nanodiagnostics and Nanotherapeutics, Journal of Law, Medicine & Ethics**, v. 40, n. 4, p. 795-801, dec. 2012.

OECD (2014). Test No. 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test, **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals**, Section 4, 2014.

OWENS, D. E.; PEPPAS, N. A. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 307, n. 1, p. 93-102, jan. 2006.

PATLOLLA A., KNIGHTEN B., TCHOUNWOU P. Multiwalled carbon nanotubes induce cytotoxicity, genotoxicity and apoptosis in normal human dermal fibroblast cells. **Ethnicity and Disease**, v. 20, n. 1, p. 65-71, jul. 2010.

PONTI, J. *et al.* Morphological transformation induced by multiwall carbon nanotubes on Balb/3T3 cell model as an in vitro end point of carcinogenic potential. **Nanotoxicology**, v. 7, n. 2, p. 221–233, mar. 2013.

RICCARDI, C.S.; DOS SANTOS, M.L.; GUASTALDI, A.C. Engineered Nanomaterials. **Nanotoxicology issues, Nanosafety and Regulatory affairs**, ed. Academic Culture, 2015.

ROSA, R. M. Cytotoxicity, genotoxicity and mutagenic potential for diphenyl diselenete in mammalian cells. Thesis presented to the postgraduate program in Biological Sciences: Biochemistry of the Federal University of Rio Grande do Sul, 2008.

SARGENT, L. M. *et al.* Induction of aneuploidy by single-walled carbon nanotubes. **Environ. Mol. Mutagen**, v. 50, n. 8, p. 708-717, oct. 2009.

SHARMA, C. S. *et al.* Single-Walled Carbon Nanotubes Induces Oxidative Stress in Rat Lung Epithelial Cells. **J Nanosci Nanotechnology**, v. 7, n. 7, p. 2466–2472, jul. 2007.

SIEGRIST, K. J. Genotoxicity of multi-walled carbon nanotubes at occupationally relevant doses. **Particle Fibre Toxicology**, v.11, n. 11, p. 6, jan. 2014.

SINGH, N.P., *et al.* A simple technique for quanti-tation of low levels of DNA damage in individual cells, Exp. **Cell Res.**, v. 175, n. 1, p. 184–191, mar. 1988.

STURLA, S.J. Systems toxicology: from basic research to risk assessment. **Chem. Res. Toxicol**, v. 27, n. 3, p. 314–329, jan. 2014.

SZENDI, K.; VARGA, C. - Lack of genotoxicity of carbon nanotubes in a pilot study. **Anticancer Research**, v. 28, n. 1A, p. 349-52, jan-fev. 2008.

TEEGUARDEN, JG., *et al.* Particokinetics in vitro: dosimetry considerations for in vitro nanoparticle toxicity assessments. **Toxicol Sci.**, v. 95, n. 2, p. 300–312, feb. 2007.

THOMGKAM, W., *et al.* Oxidant generation, DNA damage and cytotoxicity by a panel of engineered nanomaterials in three different human epithelial cell lines. **Mutagenesis**, v. 32, n.1, p. 105–115, jan. 2017.

TICE R.R., *et al.* Single cell gel/comet assay: guidelinesfor in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environ. Mol. Mutagen**, v. 35, n. 3, p. 206–221, jun. 2000.

URSINE, C. L., *et al.* Comparative cyto -genotoxicity assessment of functionalized and pristine multi-walled carbon nanotubes on human lung epithelial cells. **Toxicology in vitro**, v. 26, n. 10, p. 831–840, jan. 2012.

WIRNITZER, U., *et al.* Studies on the in vitro genotoxicity of baytubes agglomerates of engineered multi-walled carbon-nanotubes (MWCNT). **Toxicology Letters**. v.186, n. 3, p. 160-165, may. 2009.

ZENI, O. *et al.* Cytotoxicity investigation on cultured human blood cells treated with single-wall carbon nanotubes. **Sensors**, v. 8, n. 1, p. 488–99, jan. 2008.

Appendix A. Supplementary data

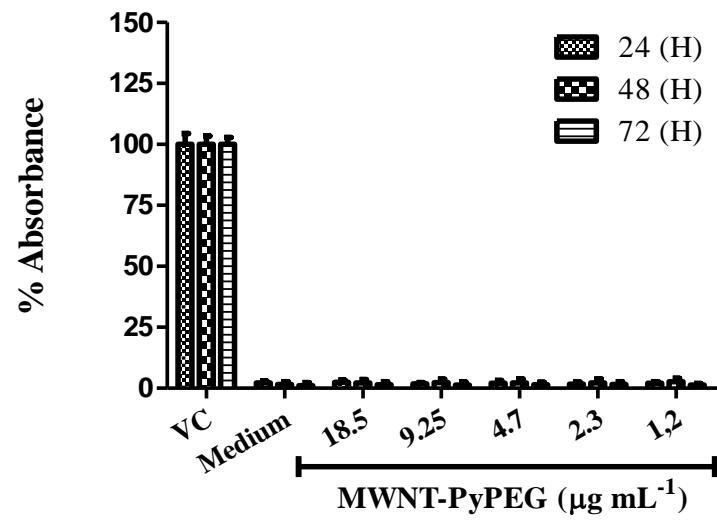


Figure S1. Evaluation of the MWNT-PyPEG interference in reducing MTT to formazan. Data represent the mean \pm standard deviation of three determinations (SD; n=6).

4 Perspectivas

- Avaliar o ciclo celular e perfil de morte (apoptose ou necrose) na linhagem V79 -4, após a exposição aos MWNT-PyPEG, na presença do ativador metabólico S9, em concentrações cujo efeito citotóxico foi determinado;
- Avaliar as vias pelas quais ocorre a morte celular, após a biotransformação, quais enzimas participam desse processo e quais mecanismos estão envolvidos na toxicidade desses NM.

5 Referências Bibliográficas

AHMAD, F.; ZHOU, Y. Pitfalls and Challenges in Nanotoxicology: A Case of Cobalt Ferrite (CoFe₂O₄) Nanocomposites. **Chem. Res. Toxicol**, v. 30, n. 2, p. 492–507, jan. 2017.

ANDERSEN, A.J., *et al.* Complement: Alive and kicking nanomedicines. **Journal Biomedicine Nanotechnology**, v. 5, n. 4, p. 364–372, aug. 2009.

BAUGHMAN, R. H.; ZAKHIDOV, A.A.; DE HEER, W. A. Review: carbon nanotubes – The route toward applications. **Science**, v. 297, n. 5582, p. 787-792, aug. 2002.

BLEEKER, E.A *et al.* Consideration son the EU definition of a nanomaterial: science to support policy making. **Regul. Toxicol. Pharmacol**, v. 65, n. 1, p. 119–125, feb. 2013.

BOHOLM, M.; ARVIDSSON, R. Definition Framework for the Terms Nanomaterial and Nanoparticle. Studies of New and Emerging Technologies – **NanoEthics**, v.10, n. 1, p. 25–40, dec. 2016.

CANADY, R.A. The Uncertainty of Nanotoxicology: Report of a Society for Risk Analysis Workshop. **Risk Analysis**, v. 30, n. 11, p. 1663-1670, oct. 2010.

CARUSO, F.; HYEON, T.; ROTELLO, V. Nanomedicine - **Chemical Society Reviews**, V. 41, n. 7, p. 2537–2538, mar. 2012.

CHEN *et al.* Advanced nuclear analytical and related techniques for the growing challenges in nanotoxicology. **Chemical Society Reviews**, v 42, n. 21, p. 8266-8303, jul. 2013.

CHEN, C.; CHAI, Z.; GAO Y. Nuclear Analytical Techniques for Metallomics and Metalloproteomics, **RSC Publishing**, Cambridge, p. 397 - 428, jun. 2010.

CHOI, H.S *et al.* Rapid translocation of nanoparticles from the lung airspaces to the body. **Nature Biotechnology**, v. 28, n. 12, p. 1300–1303, dec. 2010.

CIMBALUK, G. V. *et al.* Evaluation of multi-walled carbon nanotubes toxicity in two fish species. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 150, p. 215–223, jan. 2018.

COCCINI, T., *et al.* Effects of water-soluble functionalized multi-walled carbon nanotubes examined by different cytotoxicity methods in human astrocyte D384 and lung A549 cells. **Toxicology**, v. 269, n. 1, p. 41–53, feb. 2010.

COHIGNAC, V., *et al.* Autophagy as a Possible Underlying Mechanism of Nanomaterial Toxicity. **Nanomaterials**, v. 4, p. 548-582, jul. 2014.

COSTA, P.M.; FADEEL, B. Emerging systems biology approaches in nanotoxicology: Towards a mechanism-based understanding of nanomaterial hazard and risk. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 299, p. 101–111, may. 2016.

DANESHIAN *et al.* A Framework Program for the Teaching of Alternative Methods (Replacement, Reduction, Refinement) to Animal Experimentation. **Altex**, v. 28, n. 4, p. 4-11, dec. 2011.

DARNE *et al.* Cytotoxicity and Genotoxicity of Panel of Single- and Multi-walled Carbon Nanotubes: In Vitro Effects on Normal Syrian Hamster Embryo and Immortalized V79 Hamster Lung Cells. **Journal of Toxicology**, v. 2014, n. 1, p. 872195, dec. 2014.

DAVEY, G.; GEBREHANNA, E.; ADEYEMO, A. *et al.* Podoconiosis: a tropical model for 1172 gene-environment interactions? **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 101, n. 1, p 91–96, jan. 2007.

DAWSON, K.A.; ANGUISSOLA, S.; LYNCH, I. The need for in situ characterisation in nanosafety assessment: funded transnational access via the Q Nanoresearch infrastructure, **Nanotoxicology**, v. 7, n. (1-4), p. 346–349, may. 2013.

DREZEK. R.; LEWINSKI, N.; COLVIN, V. Cytotoxicity of Nanoparticles. **Small**, v. 4, n. 1, p. 26 – 49, jan. 2008.

EMA, M. *et al.* Length effects of single-walled carbon nanotubes on pulmonary toxicity after intratracheal instillation in rats. **The Journal of Toxicological Sciences**, v. 42, n. 3, p. 367-378, mar. 2017.

FABBRO, C. *et al.* Targeting carbon nanotubes against cancer. **Chem. Commun**, v. 48, p. 3911-3926, feb. 2012.

FADEEL, B., *et al.* Keeping it real: The importance of material characterization in nanotoxicology. **Biochemical and Biophysical Communications**, v. 468, n. 2015, p. 498 – 503, jun. 2015.

FANIZZA, C. *et al.* Human epithelial cells exposed to functionalized multiwalled carbon nanotubes: interactions and cell surface modifications. **Journal of Microscopy**, v. 259, n. 3, p. 173–184, sep. 2015.

FENECH M. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a “cytome” assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death, **Mutation Research**, v. 600, n. (1-2), p. 58-66, aug. 2006.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature**, v. 682, n. 5, p. 217– 234, may. 2007.

FENECH, M. The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. **Mutation Research**, v. 392, n. (1-2), p. 11-18, aug. 1997.

FENECH, M. The *in vitro* micronucleus technique. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 45, n. (1-2), p. 81– 95, nov. 2000.

GAMUCCI, O., *et al.* Biomedical Nanoparticles: Overview of Their Surface Immune-Compatibility. **Coatings**, v. 4, n. 1, p. 139-159, feb. 2014.

GE, C., *et al.* Binding of blood proteins to carbon nanotubes reduces cytotoxicity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 41, p. 16968–16973, oct. 2011.

GEORGE *et al.* An Investigation of the Genotoxicity and Interference of Gold Nanoparticles in Commonly Used In Vitro Mutagenicity and Genotoxicity Assays. Oxford - Society of Toxicology - **Toxicological Sciences**, v. 156, n.1, p. 1–18, mar. 2016.

GONZALEZ, L.; SANDERSON, B.J.; KIRSCH-VOLDERS, M. - Adaptations of the *in vitro* micronuclei assay for the genotoxicity assessment of nanomaterials. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 185-191, jan. 2011.

GUNASEKARANA, V.; RAJ, G. V.; CHAND, P.A. Comprehensive Review on Clinical Applications of Comet Assay. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 9, n. 3, p. GE01-GE05, mar. 2015.

GUNSOLUS, I. L.; HAYNE, C. L. Analytical Aspects of Nanotoxicology. **Analytical Chemistry**, v. 88, n. 1, p. 451–479, jan. 2016.

HANIU, H., *et al.* Culture medium type affects endocytosis of multi-walled carbon nanotubes in BEAS-2B cells and subsequent biological response. **Toxicol in Vitro**, v. 27, n. 3, p. 1679–1685, sep. 2013.

HAYNES, C. L. The emerging field of nanotoxicology. **Anal Bioanal Chemistry**, v. 398, p. 587–588, jul. 2010.

HE, H. DNA and carbon nanotube as medicine. **Advanced Drug Delivery Systems**. v.62, n. 6, p. 633-649, apr. 2010.

HEISTER, E., *et al.* Are Carbon Nanotubes a Natural Solution? Applications in Biology and Medicine. **Applied Materials and Interfaces**, v. 5, n. 6, p. 1870-1891, mar. 2013.

HOBSON, D.W *et al.* Applied Nanotoxicology: The Toxicology of Nanomaterials and Nanostructures. **International Journal of Toxicology**, v. 35, n. 1, p. 5-16, may. 2016.

HOVHAVVISYAV, G. G.; HAROWTWVYAVH, T. F.; ARWTYWVYAV, R. M. Evaluation of cisplatin–dna crosslinks formation with uv–c application by the alkaline comet–assay. **Exp Oncol**, v. 26, n. 3, p. 240–242, sep. 2004.

HUK, A., *et al.* Critical factors to be considered when testing nanomaterials for genotoxicity with the comet assay. **Mutagenesis**, v. 30, n. 1, p. 85–88, jan. 2015.

HUSSAIN *et al.* At the Crossroads of Nanotoxicology in vitro: Past Achievements and Current Challenges. **Toxicological Sciences**, v. 147, n. 1, p. 5–16, sep. 2015.

JIANG, Y., *et al.* Modulation of apoptotic pathways of macrophages by surface-functionalized multi-walled carbon nanotubes. **PLoS One**, v. 8, n. 6, p. 65756, jun. 2013.

KANDAROVA, H.; LETASIOVA, S. Alternative methods in toxicology: pre-validated and validated methods. **Interdiscip Toxicol**, v. 4, n. 3, p. 107-13, sep. 2011.

KARLSSON, H.L. The comet assay in nanotoxicology research. **Anal Bioanal Chem**, v. 398, n. 2, p. 651–666, sep. 2010.

KIM, J.S. *et al.* Aspect ratio has no effect on genotoxicity of multi-wall carbon nanotubes. **Archives of Toxicology**, v.85, n. 7, p. 775-786, jul. 2010.

KIRKLAND, D. *et al.* A core in vitro genotoxicity battery comprising the Ames test plus the in vitro micronucleus test is sufficient to detect rodent carcinogens and in vivo genotoxins. **Elsevier - Mutation Research**, v. 721, n. 1, p. 27–73, mar. 2011.

KONG, B. *et al.* Experimental considerations on the cytotoxicity of nanoparticles. **Nanomedicine**, v. 6, n. 5, p. 929–941, jul. 2011.

KRANENDONK, M., *et al.* Heterologous expression of xenobiotic mammalian-metabolizing enzymes in mutagenicity test bacteria: an update and practical considerations. **Crit. Rev. Toxicol, Cleveland**, v. 30, n. 3, p.287-306, may. 2007.

KREUPL, F., *et al.* Carbon nanotubes for interconnect applications. **Microelectronic Engineering**, v. 64, n. (1-4), p. 399-408, oct. 2004.

KUMARI, S.; MG, S.; MAYOR, S. Endocytosis unplugged: Multiple ways to enter the cell. **Cell Res.**, v 20, n. 3, p. 256–275, mar. 2010.

KWON, J.Y.; KOEDRITH, P.; SEO, Y.R. Current investigations into the genotoxicity of zinc oxide and silica nanoparticles in mammalian models in vitro and in vivo: carcinogenic/genotoxic potential, relevant mechanisms and biomarkers, artifacts, and limitations. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, n. 2, p. 271–286, dec. 2014.

LANGLEY, G. Advanced Security Science and Health Research in Brazil - using tools and without animals. **Human Society International**, 2017. Disponível em: http://www.hsi.org/issues/advancing_science/research/horizon2020report.pdf. Acesso em: 22 Jul. 2017.

LAURENT *et al.* Crucial Ignored Parameters on Nanotoxicology: The Importance of Toxicity Assay Modifications and “Cell Vision”. **PLoS ONE**, v. 7, n. 1, p. 29997, jan. 2012.

LESNIAK, A., *et al.* Effects of the presence or absence of a protein corona on silica nanoparticle uptake and impact on cells. **ACS Nano**, v. 6, n. 7, p. 5845–5857, jun. 2012.

LI, B.L., *et al.* Nano CoFe₂O₄ supported antimony(III) as an efficient and recyclable catalyst for one-pot three-component synthesis of multisubstituted pyrroles. **RSC Advances**, v.4, n. 25, p. 12929–12943, feb. 2014.

LINDBERG, H. K. *et al.* Genotoxicity of short single-wall and multi-wall carbon nanotubes in human bronchial epithelial and mesothelial cells in vitro. **Toxicology**, v. 313, n.1, p. 24-37, nov. 2013.

LIU, S. *et al.* Water dispersed multi-walled carbon nanotubes modified by tannin acid. **Elsevier - Materials Letters**, v. 123, n. 1, p. 44–47, may. 2014.

MAURER-JONES, M.A., HAYNES, C.L. Toward correlation in in vivo and in vitro Nanotoxicology Studies. Nanodiagnostics and Nanotherapeutics. **Journal of Law, Medicine & Ethics**, v. 40, n. 4, p. 795-801, dec. 2012.

MAYNARD, A.D.; WARHEIT, D.B.; PHILBERT, M.A. The new toxicology of sophisticated materials: nanotoxicology and beyond. **Toxicology Science**, v. 120, n. 1, p. S109–S129, mar. 2011.

MONOPOLI, M. P., *et al.* Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. **Nature nanotechnology**, v. 7, n. 12, p. 779-86, dec. 2012.

MUSA, M., *et al.* Genotoxicity evaluation of dental restoration nanocomposite using comet assay and chromosome aberration test. **Nanotechnology**, v. 24, n. 1, p. 13, jan. 2012.

NAGAMUNE, T. Biomolecular engineering for nanobio/bionanotechnology. **Nano Convergence**, v. 4, n. 1, p. 9, apr. 2017.

NEL, A.; ZHAO, Y.; MADLER, L. Environmental health and safety considerations for nanotechnology. **Acc Chem Res.**, v. 46, n. 3, p. 605-606, mar. 2013.

NICOLETTE, J. Genetic Toxicology Testing. In Faqi, A. S. A Comprehensive e Guide to Toxicology in Preclinical Drug Development. 1^a ed., **Editora Elsevier**, p. 141-162, nov. 2013.

NOVOSELOV, K.S. *et al.* Electric field effect in atomically thin carbon films. **Science**, v. 22, n. 5696, p. 666-669, oct. 2004.

OECD (2014). Test No. 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test, **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals**, Section 4, 2014.

OWENS, D. E.; PEPPAS, N. A. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 307, n.1, p. 93-102, jan. 2006.

PASCHOALINO, M.P.; MARCONE, G.P.S.; JARDIM W F. Nanomaterials and the environmental issue. **New Chemistry**, v. 33, p. 421-430, 2010.

PELAZ, G.; CHARRON, C.; PFEIFFER, Y.; ZHAO, J.M.; DE LA FUENTE, X.J.; LIANG, W.J.; PARAK, P.D.P. Interfacing engineered nanoparticles with biological systems: anticipating adverse nano-bio interactions. **Small**, v. 9, n. (9-10), p. 1573–1584, may. 2013.

PIPERIGKOU, Z. *et al.* Emerging aspects of nanotoxicology in health and disease: From agriculture and food sector to cancer therapeutics. **Food and Chemical Toxicology**, v. 91, p. 42 – 57, may. 2016.

PLANT, N. Strategies for using in vitro screens in drug metabolism. **Drug Discovery Today**, v. 9, n. 7, p. 328-336, apr. 2004.

PRAMOD, B. J., *et al.* Nanosystems: Role in Oncology - An Overview. **Indian Journal of Dental Sciences**, v. 5, n. 1, p. 2231-2293, mar. 2013.

PUMERA. Nanotoxicology: The Molecular Science Point of View. **Chem. Asian J.**, v. 6, n. 2, p. 340 – 348, aug. 2011.

QI, W. *et al.* Curing the Toxicity of Multi-Walled Carbon Nanotubes through Native Small-molecule Drugs. **Nature**, v. 7, n. 1, p. 2815, jun. 2017.

RAFFA, V., *et al.* Physicochemical properties affecting cellular uptake of carbon nanotubes. **Nanomedicine**, v. 5, n. 1, p. 89–97, jan. 2010.

RENAMA – National Network of Alternative Methods - Ministry of Science, Technology, Innovation and Communications. Available in: <http://renama.org.br/>. Acessado em 2017.

RICCARDI, C.S.; DOS SANTOS, M.L.; GUASTALDI, A.C. Engineered Nanomaterials. **Nanotoxicology issues, Nanosafety and Regulatory affairs**, ed. Cultura Acadêmica, 2015.

RISS, T.; MORAVEC, R.; NILES, A. and BENINK, H. Cell Viability Assays. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/#_mттassays_References_\nhttp://europepmc.org/abstract/MED/23805433. Acessado em 2017.

RIVERA, G. P., *et al.* Correlating physicochemical with toxicological properties of nanoparticles: the present and the future. **ACS Nano.**, v. 26, n. 10, p. 5527–5531, oct. 2010.

ROSA, R. M. Citotoxicidade, genotoxicidade e potencial mutagênico por disseleneto de difenila em células de mamíferos. Tese apresentada ao programa de pós-graduação em Ciências Biológicas: **Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, 2008.

SAWANT, S. G.; FIELDEN, M. R. and BLACK, K. A. Evaluation of genotoxicity testing of FDA approved large molecule therapeutics. Elsevier - **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 70, n. 1, p. 87-97, oct. 2014.

SCARSELLI, M.; CASTRUCCI, P.; DE CRESCENZI, M. Electronic and optoelectronic nano-devices based on carbon nanotubes. **Journal of Physics: Condensed Matter**, v. 24, n. 31, p. 313, aug. 2012.

SHI *et al.* Nanotechnology in Drug Delivery and Tissue Engineering: From Discovery to Applications. **Nano Letters**, v. 10, n. 9, p. 3223–3230, sep. 2010.

SHVEDOVA, A.A.; KAGAN, V.E.; FADEEL, B. Close encounters of the small kind: adverse effects of man-made materials interfacing with the nano-cosmos of biological systems. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 50, n. 1, p. 63–88, feb. 2010.

SINGH, C.; GOYAL, A.; SINGHAL, S. Nickel-doped cobalto ferrite nanoparticles: efficient catalysts for the reduction of nitroaromatic compounds and photo-oxidative degradation of toxic dyes. **Nanoscale** v. 6, n. 14, p. 7959–7970, jul. 2014.

SINGH, N., *et al.* NanoGenotoxicology: The DNA damaging potential of engineered nanomaterials. **Biomaterials**, v. 30, n. (23–24), p. 3891–3914, aug. 2009.

SINGH, V., *et al.* Graphene based materials: Past, present and future. **Progress in Materials Science**, v. 56, n. 8, p. 1178, oct. 2011.

STONE, V.; JOHNSTON H.; SCHINS, R.P.F. Development of in vitro systems for nanotoxicology: methodological considerations. **Informa Healthcare Critical Reviews in Toxicology**, v. 39, n. 7, p. 613–626, aug. 2009.

STURLA, S.J. Systems toxicology: from basic research to risk assessment. **Chem. Res. Toxicol**, v. 27, n. 3, p. 314–329, jan. 2014.

TAN. *et al.* In vitro drug release characteristic and cytotoxic activity of silibinin-loaded single walled carbon nanotubes functionalized with biocompatible polymers. **Chemistry Central Journal**, v. 12, n. 1, p. 10-81, dec. 2016.

TENZER, S., *et al.* Rapid formation of plasma protein corona critically affects nanoparticle pathophysiology. **Nature Nanotechnology**, v. 8, n. 1, p. 772–781, sep. 2013.

THOMGKAM, W., *et al.* Oxidant generation, DNA damage and cytotoxicity by a panel of engineered nanomaterials in three different human epithelial cell lines. **Mutagenesis**, v. 32, n. 1, p. 105–115, jan. 2017.

TIMBRELL, J. A. Principles of Biochemistry Toxicology. 4^a Edição. Nova Iorque. **Editora Informa Healthcare**. p.12-14, 2009.

TSUKAHARA, T.; MATSUDA, Y.; HANIU H. The Role of Autophagy as a Mechanism of Toxicity Induced by Multi-Walled Carbon Nanotubes in Human Lung Cells. **Nanomedicine. International Journal Molecular Science**, v. 16, p. 40-48. 2015.

UDROIU and SGURA. Cytogenetic tests for animal production: state of the art and perspectives. **Animal Genetics** - Stichting International Foundation for Animal Genetics, v. 48, n. 5, p. 505-515, oct. 2017.

VARDHARAJULA, S., *et al.* Functionalized carbon nanotubes: biomedical applications. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, n. 1, p. 5361–5374, oct. 2012.

VOLDER, M. F. L., *et al.* Carbon Nanotubes: Present and Future Commercial Applications. **Science**, v. 339, n. 6119, p. 535-539, feb. 2013.

WANG, L., *et al.* Revealing the binding structure of the protein corona on gold nanorods using synchrotronradiation-based techniques: understanding the reduced damage in cell membranes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 135, n. 46, p. 17359–17368, nov. 2013.

WATSON, J. D., *et al.* **Biologia Molecular do Gene** - 7ed. Editora Artmed, 2015.

WINKLER., *et al.* Applying Quantitative structure-activity relationship approaches to nanotoxicology: Current status and future potential. **Toxicology**, v. 303, n. 1, p. 15-23, nov. 2012.

WOLFRAM, J., *et al.* The nano-plasma interface: Implications of the protein corona. **Colloids Surf B: Biointerfaces**, v. 124, n. 1, p. 17-24, dec. 2014 a.

WOLFRAM, J., *et al.* Safety of Nanoparticles in Medicine. **Current drug targets**, v. 16, n. 14, p. 1671-1681, jul. 2014 b.

WÖRLE-KNIRSCH, J.M; PULSKAMP, K.; KRUG, H.F. Oops they did it again! Carbon nanotubes hoax scientists in viability assays. **Nano Letters**, v. 6, n. 6, p. 1261–1268, apr. 2006

ZHANG, T., *et al.* Comparison of cytotoxic and inflammatory responses of pristine and functionalized multi-walled carbon nanotubes in RAW 264.7 mouse macrophages. **Journal of Hazardous Materials**, v. 219–220, n. 1, p. 203–212, jun. 2012.

ZHANG, Y. *et al.* Mechanistic Toxicity Evaluation of Uncoated and PEGylated Single-Walled Carbon Nanotubes in Neuronal PC12 Cells. **ACS Nano**, v. 5, n. 9, p. 7020-7033, sep. 2011.

ZHAO, X.; LIU, R. Recent progress and perspectives on the toxicity of carbon nanotubes at organism, organ, cell, and biomacromolecule levels. **Environment International**, v. 40, n. 1, p. 255-256, apr. 2011.

ZHU, M., *et al.* Physicochemical properties determine nanomaterial cellular uptake, transport, and fate. **Accounts of Chemical Research**, v. 46, n. 3, p. 622–631, mar. 2013.

ZUO, G., *et al.* Interactions between proteins and carbon-based nanoparticles: exploring the origin of nanotoxicity at the molecular level. **Small**, v. 9, n. (9-10), p. 1546–1556, May. 2013.