

Stress oxidativo e alterações enzimáticas induzidas por nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNTs) funcionalizados com polietileno glicol no tecido hepático de camundongos

Silvia Pierre Irazustaⁱ

Elaine Conceição de Oliveiraⁱⁱ

Helder José Ceragioliⁱⁱⁱ

Bruno Fernando Santos de Souza^{iv}

Monique Culturato Padilha Mendonça^v

Edilene Siqueira Soares^{vi}

Romildo Azevedo Júnior^{vii}

Maria Alice da Cruz-Höfling^{viii}

Zilma Maria Almeida Cruz^{ix}

Registro DOI: <http://dx.doi.org/10.22280/revintervol11ed1.366>

Resumo

Avaliou-se a toxicidade de dois nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT) funcionalizados com PEG, NT1-PEG e NTC-PEG, em fígado de camundongos, 72 h após administração e.v, a 100, 150 e 200 µg / animal. Procedeu-se análise histológica, morfometria da veia centrilobular, atividade antioxidante da SOD e da CAT. O tratamento com MWCNTs-PEG não apresentou diferença clínica comparado ao controle e nenhum processo inflamatório. NT1-PEG produziu alterações mais intensas em enzimas hepáticas que o NTC-PEG, além de causar aumento do diâmetro da veia centrilobular. A administração de MWCNTs induziu toxicidade leve e apenas com 200 µg, provavelmente pela produção de ROS.

Palavras-chave: MWCNT. Fígado. SOD. CAT.

Oxidative stress and enzymatic alterations induced by multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) functionalized with polyethylene glycol in mouse liver tissue

Abstract

The toxicity of two multi-walled carbon nanotubes (MWCNT) functionalized with PEG, NT1-PEG and NTC-PEG was evaluated in mice liver 72 h after e.v administration at 100, 150 and 200 µg /animal. Histological analysis, centrilobular vein morphometry, antioxidant activity of SOD and CAT were performed. Treatment with MWCNTs-PEG showed no clinical difference compared to control and no inflammatory process. NT1-PEG produced more intense alterations

in hepatic enzymes than NTC-PEG, in addition to increasing the diameter of the centrilobular vein, probably due to the alteration of the vascular dynamics. The administration of MWCNT induced mild toxicity and only 200 µg, probably by the production of ROS.

Keywords: MWCNT. Liver. SOD. CAT.

Recebido em 01/02/2018 Aceito em 09/02/2018

Introdução

Os nanotubos de carbono (NTCs) são folhas de grafeno enroladas em um cilindro sem costura com diâmetro de tamanho nanométrico. Dependendo do número de folhas enroladas em cilindros concêntricos, existem duas grandes categorias de NTCs, os nanotubos de carbono de parede única (SWCNTs) e nanotubos de carbono multicamadas (MWCNTs) (ELHISSI et al., 2012). Nos últimos anos, os NTCs além de sua aplicação como semicondutores, transistors, etc, foram intensamente explorados para aplicações biomédicas, devido às suas propriedades físicas e químicas intrínsecas únicas (LIU et al., 2009). Para este fim, os NTCs geralmente são modificados quimicamente (funcionalizados) para melhorar sua solubilidade e, portanto, a biocompatibilidade, conferindo efeitos tóxicos reduzidos. Um dos métodos de funcionalização mais utilizados é a conjugação com polietileno glicol (PEG) (BOTTINI et al., 2011; TAN et al., 2014).

Os mecanismos de toxicidade geralmente incluem estresse oxidativo, causando peroxidação lipídica, danos ao DNA e mudanças na atividade de complexos enzimáticos (AHAMED et al., 2015; ALARIFI; ALI, 2015; BERGAMASCHI et al., 2008; GAILLET; ROUANET, 2006; MURRAY et al. , 2015). As enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) são enzimas antioxidantes comumente usadas como biomarcadores para identificar processos de desintoxicação (ATLI; CANLI, 2007, FERREIRA-CRAVO et al., 2009).

Muito provavelmente, o contato acidental ou involuntário com nanomateriais ocorre através de tecido pulmonar ou dérmico. No pulmão, esses nanomateriais se espalham rapidamente na corrente sanguínea para outros órgãos por absorção e dispersão. Sabendo-se que o fígado recebe e acumula materiais em volumes muito maiores em comparação com outros órgãos e ao lado dos rins, é responsável pela depuração de nanomateriais do sangue

(SADAUSKAS et al., 2009; SEMMLER-BEHNKE et al., 2008), este órgão tem um papel na homeostase metabólica (KMIEC, 2001).

Estudos anteriores com MWCNT, nomeados pelo nosso grupo como simples NT1 testaram sua toxicidade em diferentes modelos experimentais, mas nenhum efeito tóxico importante foi encontrado (ANDRADE et al., 2014). Pelo contrário, a administração sistêmica dessas nanopartículas reduziu a massa tumoral de ratos *in vivo* (dados não publicados). A maioria dos estudos com SWCNTs ou MWCNTs baseou-se na resposta de modelos *in vitro* (LIU, et al., 2014; SIMON et al, 2014; WU et al., 2017). Por esta razão, tornou-se importante verificar a potencial toxicidade destas nanopartículas *in vivo*.

O objetivo deste estudo foi comparar os efeitos *in vivo* de dois MWCNTs PEGilados diferentes, no fígado de camundongos Balb / C após administração sistêmica. Para isto avaliou-se a atividade oxidativa e expressão de CAT e SOD, bem como a análise morfológica do fígado.

Materiais e métodos

Preparação e caracterização do MWCNT

Os MWCNTs denominados NTC-PEG foram produzidos, caracterizados e fornecidos pela Helix Material Solutions, Inc. (Richardson, TX, EUA). O diâmetro do tamanho das partículas variou entre 10-30 nm, comprimento de 0,5-40 μm e alta pureza (95%). Os MWCNTs denominados NT1-PEG foram sintetizados e caracterizados como descrito anteriormente (ANDRADE et al., 2014). Resumidamente, ambos os MWCNTs foram diluídos em solução salina tamponada com fosfato (PBS) com 0,1% de Pluronic F-127 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), sonicados 15 minutos em um banho ultra-sônico (Unique Ultrasound, DES 500, modelo brasileiro) e funcionalizado com PEG 6.000 para obter NTC-PEG e NT1-PEG. Para complementar a caracterização publicada anteriormente, realizou-se a espectroscopia Raman e análise do potencial zeta das nanopartículas. A configuração usada para a espectroscopia Raman é o espectrômetro Renishaw Raman (Renishaw inVia Raman - UK), com laser de diodo monomodo de 785 nm como fonte de excitação.

A técnica de dispersão de luz dinâmica (DLS) foi utilizada para a medição do diâmetro hidrodinâmico e do índice de polidispersividade dos nanotubos de carbono com um instrumento ZetaSizer Nano ZS 90 (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire / UK), a 25 °C, em ângulo de

dispersão de 90 °, utilizando cubetas de poliestireno com um comprimento de trajeto de 10 mm. O potencial zeta foi medido com o mesmo instrumento com células capilares com um comprimento de trajeto de 10 mm. A solução de MWCNTs (1 mg / mL) foi diluída (10: 1000) em água pura de 1 mL. Os resultados foram expressos como a média de três medidas.

Animais e Administração de MWCNTs-PEG

Camundongos machos Balb / C foram obtidos da Casa Animal da Universidade de Vila Velha- ES (UVV). Seis grupos de ratos (n = 5 animais / grupo, total de n = 30 camundongos) receberam uma única injeção intravenosa de 100, 150 ou 200 µg / animal (independentemente do peso) de NTC-PEG (comercial) ou NT-1- PEG (ANDRADE et al., 2014) diluídos conforme descrito acima. A concentração de 100 µg de nanotubos de carbono foi selecionada de experiências anteriores por nosso grupo (GRECCO et al., 2011), enquanto que 150 e 200 doses foram escolhidas para fornecer uma gama crescente de exposição. Os grupos controle receberam PBS com 0,1% de Pluronic F-127 (n = 5 / grupo, total de n = 30). Os ratos foram eutanasiados por deslocamento cervical após 72 h, período de exposição aguda. As amostras de fígados foram rapidamente extirpadas e fixadas em paraformaldeído a 4%, desidratadas em séries de etanol e processadas para inclusão em parafina para análises histológicas e imunohistoquímicas (IHC). Outras amostras de fígado foram congeladas a -80 °C até análise da atividade enzimática de SOD, CAT, western blot (WB) e Raman

Medição do diâmetro da veia centrilobular

Secções de parafina (5 µm de espessura) foram coradas com Hematoxilina e Eosina (HE). Para detectar alterações agudas na arquitetura vascular, mediu-se o diâmetro menor (para evitar erros se as veias não fossem perfeitamente de seção transversal) de cada veia centrilobular em 7 campos microscópicos por animal (n = 35 medidas por grupo). A média das medidas dos animais tratados foi comparada à média de controles. As medidas foram feitas usando um fotomicroscópio (BX51, Olympus, Japão), com uma ampliação de 200 x, e o software Image Pro-Plus foi usado para análise de imagens.

Determinação da atividade das enzimas antioxidantes

Superóxido dismutase (SOD)

A atividade enzimática foi determinada de acordo com a metodologia colorimétrica descrita por McCord e Fridovich (1969). Todas as medidas foram feitas em triplicata.

Catalase (CAT)

A atividade catalase promove a decomposição de peróxido de oxigênio (H_2O_2) em O_2 e H_2O . A metodologia usada foi a descrita por Beutler (1975) quantifica a taxa de decomposição de H_2O_2 diminuindo a absorvância a 230 nm a 25 °C.

Determinação da expressão de enzimas antioxidantes

Imuno-histoquímica (IHC)

As secções de parafina de amostras de fígado dos camundongos tratados com MWCNTs (NT1-PEG e NTC-PEG) foram incubadas com anticorpos monoclonais anti- SOD-1 (sc-11407) e anti- CAT (sc-271242) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA), diluídos a 1:400 e 1:500, respectivamente. O controle negativo foi realizado com 1% de albumina de soro bovino PBS (BSA) mas sem o anticorpo primário. A imunomarcagem foi feita tratando secções por anticorpo secundário e substrato de cromogênio e revelou-se com Kit de Envision-HRP de diaminobenzidina (DAB) (K400511-2 Dako, Dinamarca). A intensidade da imunomarcagem foi analisada usando fotomicroscópio Olympus BX51 (Japão), equipado com o software do analisador de imagem Image-ProPlus (Silver Spring, MD, EUA), objetivo de 20X e parâmetros fixos de iluminação. A densidade de pixels relacionada à expressão das proteínas foi avaliada usando o programa de acesso livre GIMP 2.6.4 software (GNU Image Manipulation Program, CNE, Free Software Foundation, Boston, MA, EUA), que segmenta a reação imunoquímica por cor (BARBOSA-SOUZA et al., 2011).

Western Blot (WB)

O WB foi realizado como descrito anteriormente (MENDONÇA et al., 2015). As membranas foram bloqueadas com 5% de leite desnatado, seguido de incubação durante a noite a 4 ° C com anticorpos anti- SOD-1 (1:500, sc-11407) e CAT (1:400, sc-271242) (Santa Cruz Biotechnology). Os imunoblots foram processadas com anticorpo secundário apropriado (1:1000, Santa Cruz Biotechnology) durante 2 h à temperatura ambiente e as bandas foram detectadas com kit de reagente quimioluminescente (Super Signal West Pico Substrato Quimioluminescente, Pierce Biotechnology, Rockford, IL, EUA). As bandas de borrão foram quantificadas por densitometria com o software ImageJ 1.45 (disponível em [ftp de zippy.nimh.nih.gov/](ftp://zippy.nimh.nih.gov/) ou de <http://rsb.info.nih.gov/nih-image>, desenvolvido por Wayne Rasband, NIH, Bethesda MD, EUA). A β -actina (1:1000, A2228, Sigma Aldrich) foi empregada como controle endógeno.

Análise de status metabólico

Os tecidos foram homogeneizados em tampão Tris-HCl 50 mM (razão 1: 5 p / v), pH 7,5, contendo MgCl₂ 10 mM e 5 mM de mercaptoetanol, centrifugado a 37000 g por 30 min. a 4 ° C.. A actividade é determinada no sobrenadante, em meio contendo tampão Tris de HCl 50 mM, pH 7,5 contendo 5-mercaptoetanol 5 mM, glicose 25 mM, NADP 0,55 mM, MgCL 27 mM, 0,3 UI de glucose-6-fosfato desidrogenase.

Hexoquinase (HK)

A reação foi iniciada pela adição de 50 mL de μ L de extrato enzimático e seguido pela redução de NADP a 340 nm a 25 °C. A actividade foi expressa como μ mol de produto formado / mg de proteína / min.

Fosfofrutoquinase (PFK)

A reação foi iniciada pela adição de 50 mL de μ L de extrato enzimático, acompanhada pela oxidação de NADH a 340 nm a 25 ° C. Atividade foi expressa em μ mol de produto formado / mg de proteína min.

Piruvato quinase (PK)

A reação foi iniciada pela adição de 50 mL de μ L de extrato enzimático, acompanhada pela oxidação de NADH a 340 nm a 25 ° C. A actividade foi expressa como μ mol produto formado / mg de proteína min.

Determinação da proteína total

A determinação da proteína seguiu o método descrito por Lowry et al., (1951)

Análise estatística

Todos os dados são expressos como média \pm SEM. A análise estatística foi realizada utilizando uma análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida do teste post hoc de Bonferroni. O nível de significância foi definido em $p < 0,05$. Todas as análises foram feitas usando o software Prism 5 (GraphPad Inc., La Jolla, CA, EUA).

Resultados

Morfologia e caracterização físico-química de MWCNTs PEGuilados

A Figura 1 (A e B) mostra os espectros Raman característicos do NTC-PEG e NT1-PEG. Observou-se o pico de 1324 cm^{-1} , correspondendo à banda D e ao pico de 1575 cm^{-1} , correspondendo à banda G. Os outros picos foram complementares (harmônicos) das bandas D e G, sendo 2650 cm^{-1} (duplo da banda D) e 2907 cm^{-1} (soma de D + G). A Figura 2C mostra a morfologia das múltiplas paredes do MWCNT por Microscopia Electrónica de Transmissão de Alta Resolução (HRTEM).

A Tabela 1 representa o tamanho estimado, a carga superficial (potencial zeta) e o índice de polidispersão (PDI) de MWCNTs. Também avaliamos MWCNT não PEGuilados para demonstrar a presença de PEG, uma vez que os aumentos de tamanho oferecem evidências da funcionalização das nanopartículas (DAL BOSCO et al., 2015, JOKERST et al., 2011).

Tabela 1. Análise de tamanho de partícula, PDI e potencial zeta de MWCNTs PEGuilados e não PEGuilados.

		Size (nm)		PDI		Zeta (mV)	
NTC		528	±	0.	±	-	±
	.5	42.2		638	0.029	30.1	0.9
NT1		588	±	0.	±	-	±
	.0	11.8		484	0.086	28.5	2.5
PEG		146	±17	0.	±	0	±
	4.3	9.8		835	0.128	.9	1.4
EG		171	±	0.	±	2	±
	2.7	74.6		589	0.100	.2	0.4

Cada valor representa a média ± DP (n = 3).

O NTC mostrou diâmetro hidrodinâmico médio de 528,5 nm com PDI de 0,638 e potencial zeta de -30,1 mV; Quando associado ao PEG (NTC-PEG), observamos aumento do diâmetro hidrodinâmico de 1464,3 nm, PDI de 0,835 e potencial zeta de 0,9 mV. Observou-se um resultado semelhante para NT1, que apresentou diâmetro hidrodinâmico médio de 588,0 nm e potencial zeta -28,5 mV, e quando combinado com PEG (NT1-PEG), o diâmetro hidrodinâmico atingiu 1712,7 nm e a carga superficial atingiu 2,2 mV.

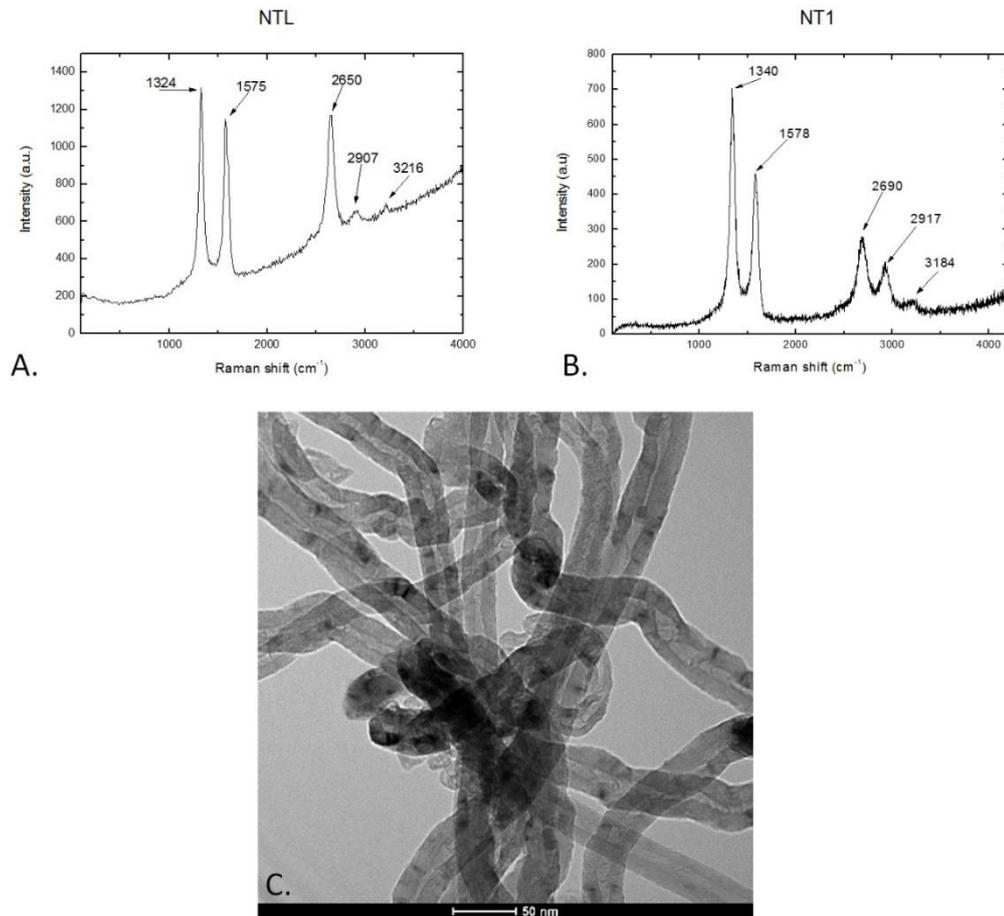


Figura 1. Características do espectro Raman de: (A) NTC-PEG and (B) NT1-PEG. (C) High-Resolution Transmission Electron Microscopy (HRTEM) of NTC-PEG. Barra de escala: 50 nm.

Medição do diâmetro da veia centrilobular hepática

Os resultados das medidas dos diâmetros das veias centrilobulares mostraram que houve mudanças significativas após a administração de MWCNTs. Foram observadas veias dilatadas com diâmetro aumentado para ambos, NT1-PEG e NTC-PEG (Figura 2 A) e edema em amostras NTC-PEG (Figura 2B, C). Além disso, vários hepatócitos mostram a condensação da cromatina e as células Kupffer ativadas.

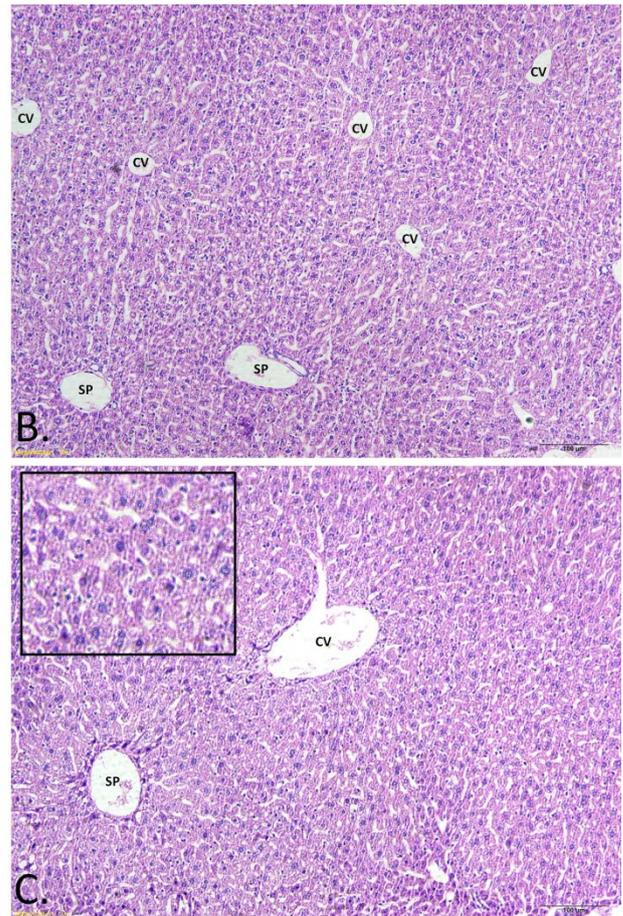
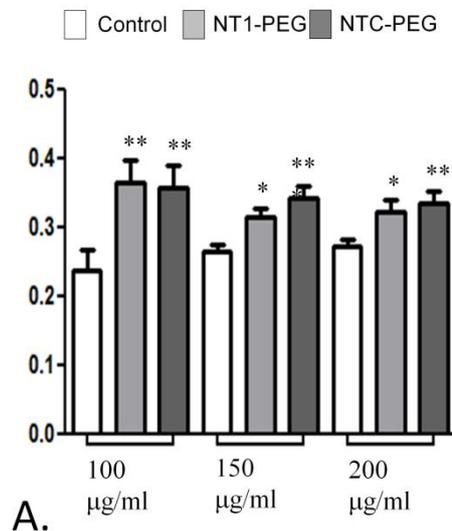


Figura 2. Diâmetro da veia centrilobular. O painel A mostra a comparação de medições do menor diâmetro centrilobular de NT1-PEG e NTC-PEG em diferentes concentrações; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ em relação ao controle. Seções representativas do parênquima hepático representadas pelas veias centrilobulares (cv) no controle ($n = 5$, painel B) e em amostras tratadas com NTC-PEG ($n = 5$, painel C): observe que as veias centrilobulares estão significativamente dilatadas após administração de NT1-PEG ($200 \mu\text{g} / \text{animal}$, $n = 5$); ps = espaço portal; Bar = $50 \mu\text{m}$.

Determinação da atividade e expressão das enzimas antioxidantes

Catalase

A análise enzimática foi realizada por meio de bioquímica (Figura 3A), IHC (Figura 3B) e WB (Figura 3C). As amostras tratadas com NT1-PEG mostraram aumentos significativos na atividade e expressão de CAT em $100 \mu\text{g} / \text{animal}$ e $150 \mu\text{g} / \text{animal}$, mas diminuíram a $200 \mu\text{g} / \text{animal}$ em comparação com os respectivos controles. A atividade antioxidante da CAT aumentou 25% a $100 \mu\text{g} / \text{animal}$ ($p < 0,05$) e 50% a $150 \mu\text{g} / \text{animal}$ ($p < 0,05$), porém diminuiu 48% a $200 \mu\text{g} / \text{animal}$ ($p < 0,05$). Nas amostras tratadas com NTC-PEG, apenas uma redução

de 49% da atividade antioxidante do CAT foi encontrada com maior concentração ($p < 0,05$). A imunomarcação anti-CAT mostrou um padrão citoplasmático (IHC).

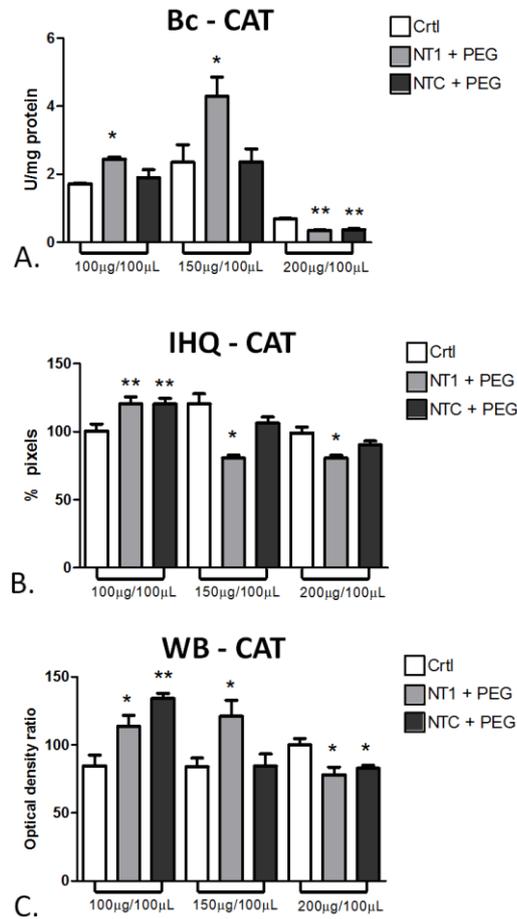


Figura 3. Análise da enzima CAT no fígado de camundongos expostos a NTC (n = 5) (NT1-PEG e NTC-PEG), a 100; 150 e 200 µg / animal. Em A, atividade antioxidante do CAT por técnica bioquímica; em B, expressão de CAT por imuno-histoquímica (IHQ); em C, conteúdo de CAT por western blot analysis (WB); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ em relação ao respectivo controle. Os dados foram expressos em média \pm DP; ANOVA plus Bonferroni pos teste; n = 5 / por tipo MWCNT.

Superóxido Dismutase (SOD)

A exposição a NTC-PEG e NT1-PEG não alterou a atividade ou expressão de SOD em 100 µg / animal e 150 µg / animal (Figura 4). As amostras tratadas com NT1-PEG mostraram atividade antioxidante aumentada apenas com a maior concentração; a quantificação da

imunorreatividade de SOD avaliada por IHC e WB mostrou que a proteína foi aumentada com 200 μg / animal para ambos os MWCNTs (Figura 4B, C). Além disso, nesta concentração (200 μg) observou-se uma marcação nuclear intensa, não observada com as demais concentrações onde a expressão foi restrita ao citoplasma. Painel D e o detalhe mostram que a imunorreatividade SOD foi nuclear.

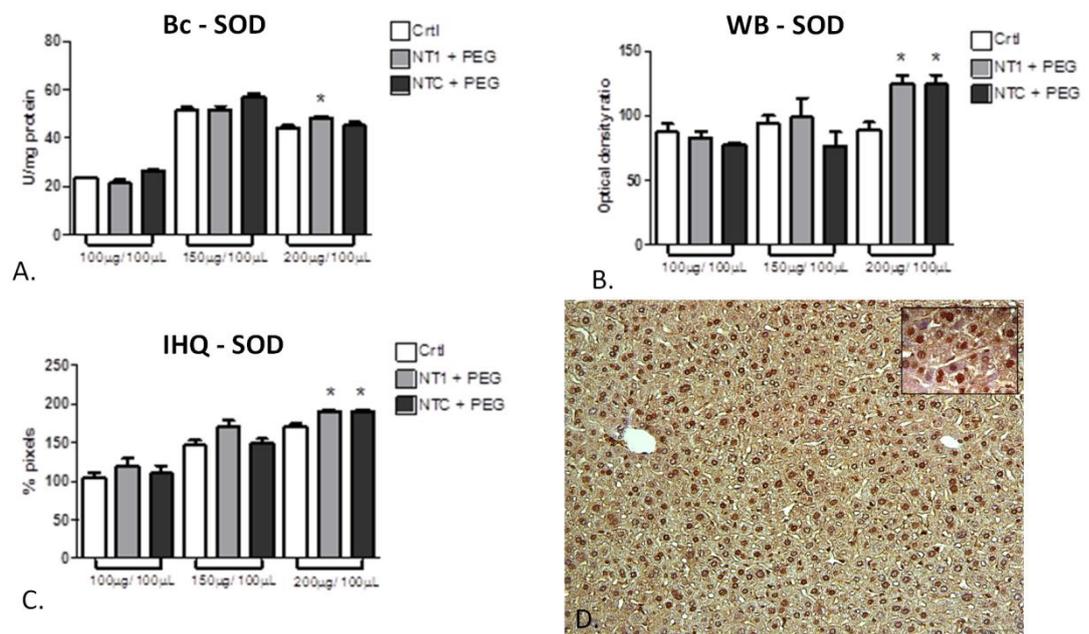


Figura 4. Análise da enzima superóxido dismutase (SOD) no parênquima hepático de camundongos expostos a MWCNTs (NT1-PEG e NTC-PEG) a 100; 150 e 200 μg / animal ($n = 5$ / cada). Em A., determinação de SOD por técnica bioquímica; em B., expressão tecidual de SOD por imuno-histoquímica (IHC); Detalhe mostra expressão nuclear; em C., quantificação SOD por western blot (WB); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. ANOVA plus Bonferroni pos teste $n = 5$ / MWCNT; Barra de escala = 50 μm .

Discussão

Tem sido relatado que os Nanotubos de Paredes Múltiplas (MWCNT) funcionalizados estão entre os mais importantes dos grupos de nanotubos de carbono, devido à sua melhor dispersão em soluções aquosas. Por tais características tornam-se amplamente utilizados como portadores de drogas (HILDER; HILL, 2008), RNA (SiRNA) e proteínas em células (LIU et

al., 2009). De alguma forma, esses MWCNTs funcionalizados são metabolizados e excretados do organismo dos animais. Estudos *in vivo* sobre o destino e as consequências biológicas dos CNTs funcionalizados são muito poucos (CHATTERJEE et al., 2014; LIU et al., 2009; PATLOLLA et al., 2011). Nosso estudo contribui para ampliar nosso entendimento sobre o assunto.

Há muitas maneiras de funcionalizar os MWCNTs, uma das mais aceitas é revestir sua superfície com PEG, um polímero biocompatível amplamente utilizado que geralmente é capaz de reduzir a toxicidade de MWCNT *in vivo*. Esta propriedade é particularmente reforçada por moléculas de PEG de alto peso molecular e altamente ramificado, resultando em comportamento farmacocinético melhorado, circulação sanguínea com meia-vida prolongada e redução da captura pelo sistema reticuloendotelial (BOTTINI et al., 2011; HUANG et al., 2010). Por exemplo, PEG2000 resulta em meia vida de circulação sanguínea de 1,2 h, enquanto PEG6000 aumenta a meia-vida a 5 h; Além disso, o uso de PEG ramificado melhora a meia-vida da circulação sanguínea até 15 h (YANG et al., 2012). PEG pode revestir o MWCNT via ligação covalente ou não covalente; em nosso estudo, a funcionalização de NT1 e NTC foi feita por ligação covalente com PEG6000.

As enzimas antioxidantes foram consideradas biomarcadores de fatores ambientais que causam lesão celular e produção de radicais livres (GERET et al., 2003; ORBEA et al., 2006). A geração de espécies de oxigênio reativo (ROS) e outros radicais livres são intermediários críticos na fisiologia do fígado. As espécies de oxigênio são importantes nos estímulos oxidativos necessários para a homeostase fisiológica normal dos hepatócitos e na expressão gênica (DIESEN; KUO, 2010). No entanto, também é correto indicar que o excesso de espécies reativas de oxigênio é prejudicial e deletério para a fisiologia hepática (TONG; YIN, 2013). De fato, há evidências abundantes que associam estresse oxidativo e distúrbios e evolução das doenças, dentre as quais a toxicidade hepática induzida por MWCNT, tanto em estudos *in vitro* como *in vivo* (DARNE et al., 2014; DONALDSON; POLAND, 2012; PATLOLLA et al., 2011).

Nossos resultados parecem indicar que uma única administração e.v. dos MWCNTs, NT1-PEG e NTC-PEG, produz uma leve indução de estresse oxidativo, uma vez que apenas a maior concentração de NT1-PEG foi capaz de promover um aumento significativo da atividade SOD. A enzima SOD é conhecida por desempenhar um papel importante na proteção antioxidante porque catalisa a reação de dismutação do anion superóxido (LIVINGSTONE,

2001). Sabe-se que a SOD está funcionalmente ligada a CAT e a atividade das duas enzimas ocorre sequencialmente nos organismos (ASAGBA et al., 2008). Neste estudo, houve aumento da atividade de SOD e de CAT paralelamente ao aumento do teor dessas enzimas (dados de IHC e WB, ver Figuras 4 e 5). Observou-se intensa marcação citoplasmática de SOD em todas as concentrações testadas para NT1-PEG e NTC-PEG. Além disso, houve expressão nuclear de SOD nos hepatócitos de animais tratados com NT1-PEG na concentração de 200 µg / animal, o que não foi observado com as concentrações mais baixas.

A enzima SOD possui duas formas isoméricas principais, uma metaloenzima contendo manganês encontrada nas mitocôndrias e outra, contendo zinco e cobre na sua estrutura, ambas distribuídas predominantemente no citossol. A isoforma Cu-Zn-SOD é expressa em peroxissomos e no espaço entre membranas mitocondriais internas e externas e também no núcleo. Na verdade, foi demonstrado anteriormente que as condições e intensidade do agente agressor podem resultar em uma redistribuição da isoforma de Cu-Zn-SOD do citossol para o núcleo (FILIPOVIĆ et al., 2010).

Outra descoberta interessante do nosso estudo refere-se ao aumento da atividade de CAT induzida pela concentração mais baixa (100 µg / animal) e intermediária (150 µg / animal) de NT1-PEG e NTC-PEG e sua diminuição induzida pela maior concentração. A CAT é uma enzima envolvida na detoxificação do peróxido, processo que desempenha papel importante quando é necessário o clearance de altas concentrações de H₂O₂ (HIRRINGLER, 2002). A ativação e intensidade da resposta da CAT com a menor concentração sugerem que esta enzima é a primeira linha de defesa desencadeada contra o stress oxidativo induzido por MWCNTs funcionalizados (NT1-PEG e NTC-PEG). A CAT é uma enzima protetora eficaz contra a peroxidação lipídica (WINSTON; DI GIULIO, 1991). Uma vez que o fígado é responsável pelo metabolismo lipídico, levantamos a hipótese de que a concentração mais baixa de NT1-PEG e NTC-PEG foi suficiente para causar danos nos lipídios hepáticos. Um aumento na atividade de CAT também foi observado no fígado de ratos tratados com p-dimetilaminobezeno e 2 (3) - tert-4-hidroxianisol (OH; LEE, 1981) e *Labeo rohita* após exposição a um corante azo (KAUR; KAUR, 2015).

Em nosso estudo, a inibição da atividade CAT foi provavelmente, decorrente do alto nível H₂O₂, produzido pela atividade da SOD. Este H₂O₂ pode ter danificado a atividade das enzimas, particularmente aquelas enzimas contendo heme, como a catalase. Sob o stress induzido pelos NT1-PEG e NTC-PEG, o fluxo de oxigênio pode ter inibido a atividade CAT

na concentração de 200 μg / animal e, ao mesmo tempo, ativou SOD. Nas concentrações mais baixas, NTC-PEG e NT1-PEG não alteraram a atividade SOD (ver Figura 5). Esse fato pode explicar a inibição da atividade CAT exposta a maior concentração de MWCNTs (ver Figura 4). Uma explicação seria que os animais deveriam ter desenvolvido mecanismos de tolerância para NT1-PEG internalizado, uma vez que os mesmos permaneceram visualmente saudáveis ao longo do ensaio biológico.

No que diz respeito às enzimas relacionadas com o controle da glicólise, a hexoquinase, a fosfofrutação e a piruvato quinase, nossos dados mostraram que a presença de NT1-PEG e NTC-PEG no citosol não interferiu nesta via metabólica sob a condição experimental aqui utilizada (dados não mostrados).

Em conjunto, nossas descobertas mostram que o NT-1-PEG e principalmente o NTC-PEG exibiram um perfil toxicológico baixo como evidenciado pelas atividades das enzimas antioxidantes. Nosso estudo está de acordo com a análise de Kermanizadeh et al. (2012) que relataram que os MWCNTs têm baixa toxicidade quando comparados com outras categorias de nanopartículas. Esses autores trataram células C3A em cultura com diferentes nanomateriais e os dividiram em dois grupos de acordo com sua capacidade de induzir citotoxicidade, um grupo de alta toxicidade (duas nanopartículas com ZnO e uma com Ag) e um grupo de baixa toxicidade, no qual foram incluídos dois MWCNTs. Nossos dados confirmam a baixa toxicidade dos dois MWCNT-PEG aqui testados. Na verdade, NTC-PEG e NT1-PEG não produziram alterações histológicas importantes e nenhum sinal convincente de processo inflamatório em curso (Figura 3). Nossos dados não reproduziram achados encontrados por Patlolla et al. (2011) que observaram vacuolização hepatocelular e degeneração da veia central e, posteriormente, atrofia hepática em camundongos expostos ao MWNTC funcionalizado. No entanto, as doses utilizadas pelos autores foram 0,25, 0,5 e 0,75 mg / kg / dia de peso corporal, administradas durante 5 dias, enquanto utilizamos uma única injeção e.v. de nanopartículas em concentrações variando de 100-200 μg / animal. Além disso, podem ser consideradas outras diferenças como o comportamento hidrodinâmico e a formação de agregados / aglomerados que foram diferentes entre o nosso e os experimentos por Patlolla et al. (2011), fatores que podem interferir na absorção e toxicidade do MWCNT (TAQUAHASHI et al., 2013).

De acordo com estudo prévio, os efeitos adversos à saúde, secundários à exposição ao MWCNT podem incluir inflamação e stress oxidativo, que podem estar associados à remodelação tecidual e à deterioração da função e / ou carcinogênese (NEL et al., 2006). Os

efeitos pró-inflamatórios podem ser influenciados pelas propriedades físicas-químicas dos CNTs, como comprimento e rigidez (Poland et al., 2008). Nossos resultados não mostraram infiltrado inflamatório visível no fígado de animais tratados com MWCNT; apesar disso, houve aumento significativo do calibre da veia centrilobular, mas apenas NT1-PEG provocou stress oxidativo e apenas com a maior concentração 72 h após a administração. Um estudo adicional é necessário para elucidar o aumento da veia centrilobular.

As discrepâncias nos achados toxicológicos encontrados na literatura podem ser atribuídas a grande variabilidade na resposta individual, o que parece estar relacionado à biodistribuição de MWCNT, dependente da hidrofobicidade das nanopartículas (AHN et al, 2011; MULLER et al., 2005). Em nosso estudo, o NTC-PEG, permaneceu altamente hidrofóbico mesmo com o uso de Pluronic 127 e sonicação. Outras experiências seriam necessárias para avaliar como os MWCNTs migram eficientemente através da corrente sanguínea para os sinusoides do fígado e o contato com células do parênquima. Esta migração seria afetada por uma variedade de fatores físicos como rigidez, densidade, diâmetro, forma, bioresistência, bem como pela atividade sequestradora dos macrófagos (MERCER et al., 2010; XU et al., 2012).

Conclusões

Em conclusão, nossas descobertas mostram que o NT1-PEG e principalmente o NTC-PEG exibiram um baixo perfil toxicológico como evidenciado pelas atividades das enzimas antioxidantes no fígado. A menor concentração de NT1-PEG e NTC-PEG induziu ativação de CAT e GST, compatível com o fato destas enzimas serem co-estimuladas. A maior concentração induziu o esgotamento de ambas as enzimas; em contraste, SOD foi ativada. O fato da SOD ter sido superexpressa no citoplasma e nos núcleos sugere que mais de uma isozima foi expressa, o que está de acordo com a redistribuição de SOD em resposta a estímulos estressores. A alteração morfológica mais significativa foi o aumento do diâmetro vascular das veias centrilobulares após exposição a ambos os MWCNT. Uma explicação para tais fenômenos é incerta, e um efeito citotóxico local não pode ser descartado. Juntos, nossos dados suportam a visão da toxicidade leve induzida por NT1-PEG e NTC-PEG, uma vez que o único distúrbio observado foi relacionado à dinâmica vascular quando a maior concentração foi administrada, provavelmente através da produção de ROS.

Lista de abreviações

ATR: reflexão de transmissão atenuada. CAT, catalase; CNT, nanotubos de carbono; CNT1, nanotubos de carbono sintetizados 'em casa'; FTIR, infravermelho de transformada de Fourier; GST, glutathione S-transferase; H.E., hematoxilina e eosina; HRTEM, Microscopia Electrónica de Transmissão de Alta Resolução; IHC, imuno-histoquímica; MWCNT, nanotubos de carbono de paredes múltiplas; NM, nanomateriais; NTC, nanotubos de carbono multi-paredes comerciais - Helix; NT1, nanotubos de carbono de paredes múltiplas sintetizados 'em casa'; PEG, polietilenoglicol; RES, sistema reticuloendotelial; ROS, espécies reativas de oxigênio; SERS, espectroscopia Raman de superfície melhorada; SOD, superóxido dismutase; WB, western blot.

Conflito de interesses

Não houve interesse político, comercial ou financeiro motivando esse trabalho.

Reconhecimentos

Este estudo foi apoiado por subsídios das agências de financiamento brasileiras Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (concessão nº 305099 / 2011-6), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Universidade Vila Velha (UVV), Fundação Nacional de Desenvolvimento do Ensino Superior e Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES). Os autores agradecem a professora Leonilda Maria Barbosa dos Santos, Ph.D., que gentilmente forneceu a CNT (Helix).

Este trabalho é dedicado ao Professor Vítor Baranauskas "In memoriam".

Referências

- AHN YN, GUPTA A, CHAUHAN A, KOPELEVICH DI. Molecular transport through surfactant-covered oil-water interfaces: role of physical properties of solutes and surfactants in creating energy barriers for transport. **Langmuir**. 15;27(6):2420-36, 2011.
- AHAMED, M., AKHTAR, M.J., ALHADLAQ, H.A., ALROKAYAN, S.A. Assessment of the lung toxicity of copper oxide nanoparticles: current status. **Nanomedicine (Lond.)**, 10: 2365-2377, 2015
- ALARIFI, S., ALI, D. Mechanisms of Multi-walled Carbon Nanotubes-Induced Oxidative Stress and Genotoxicity in Mouse Fibroblast Cells. **Int. J. Toxicol.** 34: 258-65, 2015.
- ANDRADE, L.R., BRITO, A.S., MELERO, A.M., ZANIN, H., CERAGIOLI, H.J., BARANAUSKAS, V., CUNHA, K.S., IRAZUSTA, S.P. Absence of mutagenic and recombinogenic activity of multi-walled carbon nanotubes in the *Drosophila* wing-spot test and Allium cepa test. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, 99, 92-7, 2014.
- ASAGBA, S.O., ERIYAMREMU, G.E., IGBERAESE, M.E. Bioaccumulation of cadmium and its biochemical effect on select tissues of catfish (*Clarias gariepinus*). **Fish Physiol. Biochem.**, 34: 61-69, 2008.
- ATLI, G., CANLI, M. Enzymatic response to metal exposures in a freshwater fish *Orcochronis niloticus*. **Biochem. Physiol.**, C 145: 282-287, 2007.
- BARBOSA-SOUZA, V., CONTIN, D.K., BONVENTI FILHO, W., de ARAÚJO, A.L., IRAZUSTA, S.P., da CRUZ-HÖFLING, M.A. Osteopontin, a chemotactic protein with cytokine-like properties, is up-regulated in muscle injury caused by *Bothrops lanceolatus* (fer-de-lance) snake venom. **Toxicol.**, 58: 398-409, 2011.
- BERGAMASCHI, E., BUSSOLATI, O., MAGRINI, A., BOTTINI, M., MIGLIORE, L., BELLUCCI, S., IAVICOLI, I., BERGAMASCHI, A. Nanomaterials and lung toxicity: interactions with airways cells and relevance for occupational health risk assessment. **Int. J. Immunopathol. Pharmacol.**, 19, 3-10, 2008.
- BEUTLER, E. Red cell metabolism: manual of biochemical methods. In: Grune and Stratton Inc., 3 Ed., 1975, 187 p.
- BOTTINI, M., ROSATO, N., BOTTINI, N., HUANG, X., TENG, X., CHEN, D., TANG, F., HE, J. PEG-modified carbon nanotubes in biomedicine: current status and challenges ahead. **Biomacromolecules**, 12: 3381-3393, 2011.
- DAL BOSCO, L., WEBER, G.E., PARFITT, G.M., CORDEIRO, A.P., SAHOO, S.K., FANTINI, C., KLOSTERHOFF, M.C., ROMANO, L.A., FURTADO, C.A., SANTOS, A.P., MONSERRAT, J.M., BARROS, D.M. Biopersistence of PEGylated Carbon Nanotubes Promotes a Delayed Antioxidant Response after Infusion into the Rat Hippocampus. **PLoS One**. 10(6):e0129156, 2015.
- DARNE, C., TERZETTI, F., COULAIS, C., FONTANA, C., BINET, S., GATÉ, L., GUICHARD, Y. Cytotoxicity and genotoxicity of panel of single- and multiwalled carbon nanotubes: in vitro effects on normal Syrian hamster embryo and immortalized v79 hamster lung cells. **J. Toxicol.** 2014: 1-15, 2014.

DIESEN, D.L., KUO, P.C. Nitric Oxide and Redox Regulation in the Liver: Part I General Considerations and Redox biology in Hepatitis. **J. Surg. Res.** 162: 95–109, 2010.

DONALDSON, K., POLAND, C.A. Inhaled nanoparticles and lung cancer – what we can learn from conventional particle toxicology. **Swiss Med. Wkly.**, 142: 1-9, 2012.

ELHISSI, A.M.A., AHMED, W., U.; HASSAN, I., DHANAK, V.R., D'EMANUELE, A. Carbon nanotubes in cancer therapy and drug delivery. **Journal of Drug Delivery** 2012: 10p, 2012.

FERREIRA-CRAVO, M., VENTURA-LIMA, J., SANDRINI, J.Z., AMADO, L.L., GERACITANO, L.A., REBELO, M., BIANCHINI, A., MONSERRAT, J.M. Antioxydant responses in different body regions of the polychaeta *Laconereis acuta* (Nereididae) exposed to copper. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, 72: 388-393, 2009.

FILIPOVIĆ, D., MANDIĆ, L.M., KANAZIR, D., PAJOVIĆ, S. B. Acute and/or chronic stress models modulate CuZnSOD and MnSOD protein expression in rat liver. **Mol. Cell. Biochem.**, 338: 167-74, 2010.

GAILLET, S., ROUANET, J.M. Silver nanoparticles: their potential toxic effects after oral exposure and underlying mechanisms--a review. **Food Chem. Toxicol.**, 77: 58-63, 2015.

GERET, F., SCRAFIN, A., BEBIANO, M.J. Antioxydant enzymic activiyies, metallothioneis and lipid peroxidation as biomarkers in *Ruditapes decussates*. **Ecotoxicology**, 12: 417-426, 2003.

GRECCO, A.C., PAULA, R.F., MIZUTANI, E, SARTORELLI, J.C., MILANI, A.M., LONGHINI, A.L., OLIVEIRA, E.C., PRADELLA, F., SILVA, V.D., MORAES, A.S., PETERLEVITZ, A.C., FARIAS, A.S., CERAGIOLI, H.J., SANTOS, L.M., BARANAUSKAS, V. Up-regulation of T lymphocyte and antibody production by inflammatory cytokines released by macrophage exposure to multi-walled carbon nanotubes. **Nanotechnology**, 22(26):265103, 2011.

HILDER, T.A., HILL, J.M. Modeling the loading and unloading of drugs into nanotubes. **Small.** 5(3):300-8, 2009.

HIRINGER, J., RESCH, A., GUTERRER, J.M., DRINGEN, R. Oligodendroial cells in culture effectively dispose of exogenous hydrogen peroxide: comparison with cultured neurons, astroglial and microglial cells. **J. Neurochem.**, 82: 635-644, 2002.

HUANG, X., TENG, X., CHEN, D., TANG, F., HE, J. The effect of the shape of mesoporous silica nanoparticles on cellular uptake and cell function. **Biomaterials**, 31: 438–48, 2010.

JOKERST, J.V., LOBOVKINA, T., ZARE, R.N., GAMBHIR, S.S. Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy. **Nanomedicine (Lond)**. 6(4):715-28, 2011.

KAUR, S., KAUR, A. Variability in antioxidant / detoxification enzymes of *Labeorohita* exposed to an azo dye, acid black (AB). **Comp. Biochem. and Physiol.**, Part C: 108-116, 2015.

KERMANIZADEH, A., GAISER, B.K., HUTCHISON, G.R., STONE, V. An in vitro liver model - assessing oxidative stress and genotoxicity following exposure of hepatocytes to a panel of engineered nanomaterials. **Particle and Fibre Toxicology**, 9: 28-41, 2012.

- KMIEĆ, Z. Cooperation of liver cells in health and disease. **Adv. Anat. Embryol. Cell. Biol.** 161: 1-151, 2001.
- LIU, Z., TABAKMAN, S., WELSHER, K., DAI, H.J. Carbon Nanotubes in Biology and Medicine: In vitro and in vivo Detection, Imaging and Drug Deliver. **Nano. Res.**, 2: 85–120, 2009 .
- LIVINGSTONE, D.R., 2001. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. **Mar. Pollut. Bull.**, 42: 656-666, 2001.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem.**, 193, 265-75, 1951.
- MCCORD, J.M., FRIDOVICH, I. The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen. **J. Biol. Chem.**, 25: 6056-63, 1969.
- MENDONÇA M.C.; SOARES, E.S.; DE JESUS, M.B.; CERAGIOLI, H.J.; FERREIRA, M.S.; CATHARINO, R.R.; DA CRUZ-HÖFLING, M.A. Reduced graphene oxide induces transient blood-brain barrier opening: an in vivo study. **J Nanobiotechnology.** 13:78-81, 2015.
- MERCER, R.R., HUBBS, A.F., SCABILLONI, J.F., WANG, L., BATTELLI, L.A., SCHWEGLER-BERRY, D., CASTRANOVA, V., PORTER, W.D. Distribution and persistence of pleural penetrations by multi-walled carbon nanotubes. **Part Fibre Toxicol.**, 7:28, 2010.
- MÜLLER, L., RIEDIKER, M., WICK, P., MOHR, M., GEHR, P., ROTHEN-RUTISHAUSER, B. Oxidative stress and inflammation response after nanoparticle exposure: differences between human lung cell monocultures and advanced three-dimensional model of human epithelial airways. **J. R. Soc.**, 7, S27-S40, 2010.
- NEL, A., XIA, T., MADLER, L., LI, N. Toxic potential of materials at the nanolevel. **Science**, 311: 622–7, 2006.
- OH, S.H., LEE, M.H. Effect of p-dimethylaminobezene and 2(3)-tert-4-hydroxyanisole on lipid peroxidation, glutathione-S-transferase, peroxidase and reductase in rat liver. **Yonsei Med.**, 22, 95-100, 1981.
- ORBEA, A., CAJARAVILLE, M.P. Peroxisome proliferation and antioxidant enzymes in transplanted mussels of four basque estuaries with diferent levels polycyclic aromatic hydrocarbon and polychlorinated biphenyl pollution. **Environ. Toxicol. Chem.**, 25: 1616-1626, 2006.
- PATLOLLA, A.K., BERRY, A., TCHOUNWOU, P.B. Study of hepatotoxicity and oxidative stress in male Swiss–Webster mice exposed to functionalized multi-walled carbon nanotubes. **Mol. Cell. Biochem.** 358: 189–199, 2011.
- POLAND, C. A., DUFFIN, R., KINLOCH, I., MAYNARD, A., WALLACE, W. A., SEATON, A., STONE, V., BROWN, S., MACNEE, W., DONALDSON, K. Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study. **Nat. Nanotechnol.**, 3: 423-428, 2008.
- SADAUSKAS, E., JACOBSON, N.R., DANSCHER, G., SOLTENBERG, M., LARSEN, A., KREYLING, W., WALLIN, H. Bio-disruption of gold nanoparticles in mouse lung following intratracheal instillation. **Chemistry Central Journal**, 3: 16–23, 2009.

SEMMLER-BEHNKE, M., WOLFGANG, K.G., LIPKA, J., FERTSCH, S., WENK, A., TAKENEKA, S., SCHMID, G., BRANDAU, W. Bio-distribution of 1.4 and 18 nm gold particles in rats. **Small**, 12: 2108–2111, 2008.

SIMON, A.; MALETZ, S.X.; HOLLERT, H.; SCHÄFFER, A.; MAES, H.M.; Effects of multiwalled carbon nanotubes and triclocarban on several eukaryotic cell lines: elucidating cytotoxicity, endocrine disruption, and reactive oxygen species generation. **Nanoscale Res Lett**. 9(1):396- 98, 2014.

TAN, J.M., ARULSELVAN, P., FAKURAZI, S., ITHNIN, H., HUSSEIN, M.Z. A Review on Characterizations and Biocompatibility of Functionalized Carbon Nanotubes in Drug Delivery Design. **Journal of Nanomaterials**, 8: 1-20, 2014.

TONG, X AND YIN, L. Circadian rhythms in liver physiology and liver diseases. **Comparative Physiology** 3: 917-940, 2013.

WINSTON, G.W., DI GIULIO, R.T. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. **Aquat. Toxicol**. 19: 137-161, 1991.

WU, S.; DUAN, B.; LU, A.; WANG, Y.; YE, Q.; ZHANG, L. Biocompatible chitin/carbon nanotubes composite hydrogels as neuronal growth substrates. **J. Carbohydr Polym**. 15: 174:830-840, 2017

XU, J., FUTAKUCHI, M., SHIMIZU, H., ALEXANDER, D.B., YANAGIHARA, K., FUKAMACHI, K., SUZUI, M., KANNO, J., HIROSE, A., OGATA, A., SAKAMOTO, Y., NAKAE, D., OMORI, T., TSUDA, H. Multi-walled carbon nanotubes translocate into the pleural cavity and induce visceral mesothelial proliferation in rats. **Cancer Sci.**, 103: 2045–2050, 2012.

YANG, S.T., LUO, J., ZHOU, Q., WANG, H. Pharmacokinetics, metabolism and toxicity of carbon nanotubes for biomedical purposes. **Theranostics**, 2: 271–82, 2012.

ⁱ Graduação em Farmácia pela USP; Mestrado em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual de Campinas; Doutorado em Anatomia Patológica pela Universidade Estadual de Campinas. E-mail para contato: silvia.pierre@hotmail.com

ⁱⁱ Graduação em Biologia pela Pontifícia Universidade Católica de Campinas; Mestrado em Biologia (Imunologia) pela Universidade Estadual de Campinas; Doutorado em Clínica Médica pela Universidade Estadual de Campinas.

ⁱⁱⁱ Graduação em Engenharia Química pelo Instituto Mauá de Tecnologia; Mestrado em Engenharia Química pela Universidade Estadual de Campinas; Doutorado em Engenharia Elétrica pela Universidade Estadual de Campinas; Pós-Doutorado em Engenharia Elétrica pela Universidade Estadual de Campinas.

^{iv} Graduação (licenciatura) em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de São Carlos; Mestrando em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental na Universidade Federal de São Carlos.

^v Graduação em Farmácia Bioquímica pela Fundação Educacional de Fernandópolis; Especialista em Manipulação Magistral Alopática pelo Instituto Racine com conhecimento em Desenvolvimento de Produtos Cosméticos; Mestrado em Farmacologia pela Universidade Estadual de Campinas; Doutorado em Farmacologia pela Universidade Estadual de Campinas; Pós-Doutoranda do Laboratório de Interações Nanopartículas-Células da Universidade Estadual de Campinas.

^{vi} Graduação em Ciências Biológicas (Bacharelado e licenciatura) pela Universidade Estadual de Campinas; Mestrado em Biologia Celular e Estrutural pela Universidade Estadual de Campinas; Doutorando em Biomedicina pela Universitat de Barcelona.

^{vii} Graduação em Agronomia pela Universidade Federal do Espírito Santo; Mestrado em Genética e Melhoramento pela Universidade Federal de Viçosa; Especialização em Matemática e Estatística pela Universidade Federal de Lavras; Doutorado em Ecologia de Ecossistemas pela Universidade de Vila Velha.

- viii Graduação em História Natural pela UNESP; Doutorado em Biologia pela Universidade Estadual de Campinas.
ix Graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Espírito Santo; Doutorado em Ciências Biológicas (Bioquímica) pela USP.