

TESE DE DOUTORADO

Análise morfológica e proteômica da captação de nanopartículas de dióxido de titânio por neutrófilos humanos *in vitro*.

Aluno: Everton Luís Santos da Rosa

Orientador: Prof. Dr. Wagner Fontes

Brasília, dezembro de 2012

Análise morfológica e proteômica da captação de nanopartículas de dióxido de titânio por neutrófilos humanos *in vitro*.

Trabalho realizado nos Laboratórios de Bioquímica e Química de Proteínas, Laboratório de Microscopia Eletrônica da Universidade de Brasília e no Laboratório de Espectrometria de Massa (NTBio), Sala de Nanotecnologia da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF.

Apoio financeiro: FUB/UnB, CNPq, CAPES, FAP-DF, FINEP.

Análise morfológica e proteômica da captação de nanopartículas de dióxido de titânio por neutrófilos humanos *in vitro*.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Universidade de Brasília como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor.

Aluno: Everton Luís Santos da Rosa

Banca Examinadora

Prof. Dr. Wagner Fontes UNB - Orientador

Prof.^a Dra. Consuelo Medeiros Rodrigues de Lima, UNB - Examinador interno

Prof.^a Dra. Fabiane Hiratsuka Veiga de Souza, UNB - Examinador externo

Prof.^a Dra. Graziella Anselmo Joanitti, UNB - Examinador interno

Prof.^a Dr. Maria de Lourdes Lazzari de Freitas, UNB - Examinador interno

Prof. Dr. Carlos André Ornelas Ricart, UNB - Examinador interno suplente

Brasília, 2012

DEDICATÓRIAS

A **Deus**, minha rocha e fortaleza, aquele que propiciou a oportunidade de viver em busca de realizações e da plenitude do ser.

Aos meus pais, **Gessy da Rosa** que dedicou parte de sua vida a minha formação e deu-me o sentido de obstinação e luta e **Aldo da Rosa** (*in memoriam*) pelo que aprendi com seus exemplos de perseverança e dedicação.

Aos filhos, **Filipe Torri da Rosa** e **Tiago Torri da Rosa** que compreenderam a importância da luta por nossos sonhos.

À **Suely de Fátima Araújo** companheira de todos os momentos, que me deu sustentação emocional e atenção para chegar a conclusão dessa etapa.

Ao tio **Plínio da Rosa** que sempre ouviu meus anseios deu orientações e apoio em minha carreira profissional e pelos exemplos de vida.

Júlio Evangelista e Melina Tiussi, obrigado pelo companheirismo e pelas palavras justas nas horas certas.

"A imaginação é mais importante que o conhecimento. A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original."
(Albert Einstein)

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Wagner Fontes pela perseverança no caminho científico, dedicação, humanidade e busca pelo aperfeiçoamento de todos aqueles sob sua orientação.

Agradecimento especial a Elaine, Anne, Adriana e Carlos que nos momentos cruciais da elaboração desse trabalho destinaram sua atenção e conhecimento para que eu pudesse concluí-lo.

Aos colegas e amigos do laboratório de Bioquímica pelo apoio e amizade ao longo dessa trajetória: Rainer, Jéssica, Andréa, Jaques, Adelson, Carol, Poliana, Hialy, Rodrigo, Micaella, Polyanna, Carlos Garcia, Aline, Liz, Vitório, Nuno e Antônio Rufino e outros que igualmente possam ter contribuído de alguma forma para conclusão deste trabalho.

Aos colegas Staffs e residentes do Hospital de Base pela solidariedade.

Aos colegas Cirurgiões-Dentistas e funcionários do COI e do Instituto E.R. pela atenção e apoio.

A todos os professores e funcionários do LBQP por colaborarem e incentivarem a execução deste projeto.

Ao Prof. Luciano Paulino, homem da ciência ao qual agradeço pela oportunidade de ter trabalhado e recebido conhecimentos científicos e ao grande amigo Eduardo Fernandes Barbosa por destinar seu tempo e conhecimento em formação, para transmitir-me os passos mais elementares e que levarei para o restante da minha existência.

Ao Prof. José Raimundo Corrêa pela orientação na parte de microscopia e às técnicas do laboratório de microscopia Ingrid e Márcia.

SUMÁRIO

| | | |
|----------|------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 17 |
| 1.1 | Titânio e biocompatibilidade..... | 19 |
| 1.2 | Granulopoiese de neutrófilos..... | 21 |
| 1.3 | Cinética da Produção dos Neutrófilos..... | 24 |
| 1.4 | Marginação e Diapedese dos Neutrófilos..... | 25 |
| 1.5 | Fagocitose..... | 28 |
| 1.6 | Apoptose..... | 29 |
| 1.7 | Neutrófilos em Contato com Superfícies de Titânio..... | 31 |
| 1.7.1 | Macropartículas..... | 31 |
| 1.7.2 | Micropartículas..... | 33 |
| 1.7.3 | Nanopartículas..... | 34 |
| 1.8 | Morfologia dos neutrófilos em contato com NPs de TiO ₂ | 35 |
| 1.8.1 | Formação de extensões tubulovesiculares ou citonemas..... | 38 |
| 1.8.2 | Formação de poros e vesículas na membrana..... | 39 |
| 1.8.3 | Formação de NETs..... | 41 |
| 1.9 | Mecanismos de Captação de Nanopartículas de TiO ₂ | 42 |
| 1.10 | Nanopartículas de TiO ₂ e Citotoxicidade..... | 46 |
| 1.10.1 | Homeostase Intracelular..... | 46 |
| 1.10.2 | Citotoxicidade..... | 47 |
| 1.10.3 | Propriedades físico-químicas das NPs e citotoxicidade..... | 48 |
| 1.10.4 | Influência da superfície química das NPs de TiO ₂ e citotoxicidade..... | 50 |
| 1.10.5 | Influência da forma cristalina e citotoxicidade das NPs de TiO ₂ | 51 |
| 1.10.6 | Genotoxicidade..... | 52 |
| 1.10.7 | Citotoxicidade de partículas e NPs de TiO ₂ em neutrófilos..... | 54 |
| 1.10.8 | Citotoxicidade das NPs de TiO ₂ e apoptose dos neutrófilos..... | 56 |
| 1.11 | Métodos para avaliação da Ativação dos Neutrófilos..... | 60 |
| 1.11.1 | Citometria de Fluxo..... | 60 |
| 1.11.2 | Teste do NBT..... | 61 |
| 1.12 | Microscopias..... | 62 |
| 1.12.1 | Microscopia de Luz..... | 62 |

| | | |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1.12.2 | Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)..... | 62 |
| 1.12.3 | Microanálise Elementar por Dispersão de RX..... | 63 |
| 1.12.4 | Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)..... | 63 |
| 1.12.5 | Microscopia de Força Atômica..... | 64 |
| 1.12.5.1 | Espectroscopia de Força Atômica..... | 65 |
| 1.13 | Proteômica..... | 70 |
| 1.13.1 | Eletroforese Bidimensional..... | 71 |
| 1.13.2 | Análise de Imagens..... | 72 |
| 1.13.3 | Espectrometria de Massa..... | 72 |
| 1.14 | Ligação de NPs de Titânio a Proteínas..... | 73 |
| 2 | JUSTIFICATIVA..... | 75 |
| 3 | OBJETIVOS..... | 76 |
| 4. | MATERIAIS E MÉTODOS..... | 77 |
| 4.1 | Delineamento Experimental | 77 |
| 4.2 | Coleta de sangue e separação dos neutrófilos em gradientes de <i>Percoll</i> | 78 |
| 4.2.1 | Coleta de sangue | 78 |
| 4.2.2 | Separação dos Neutrófilos e Análise celular: pureza, viabilidade e rendimento | 79 |
| 4.3 | Exposição dos Neutrófilos a NPs de TiO ₂ | 82 |
| 4.4 | Métodos para Avaliação da Ativação de Neutrófilos | 84 |
| 4.4.1 | Citometria de Fluxo- avaliação dos receptores de adesão de membrana CD- 62 L e CD- 11b..... | 84 |
| 4.4.2 | Teste do NBT-Nitroblue Tetrazolium..... | 86 |
| 4.4.2.1 | Análise Estatística | 87 |
| 4.5 | Ensaio para avaliação da capacidade fagocitária dos neutrófilos frente a NPs de TiO ₂ | 88 |
| 4.5.1 | Análise da capacidade fagocitária dos neutrófilos por Microscopia de Luz..... | 88 |
| 4.5.2 | Análise da capacidade fagocitária e migração dos neutrófilos por Videomicroscopia..... | 89 |
| 4.6 | Análise da Morfologia Celular..... | 90 |
| 4.6.1 | Microscopia de Luz..... | 90 |
| 4.6.2 | Microscopia Eletrônica de Varredura..... | 90 |
| 4.6.2.1 | Análise Elementar por Dispersão de RX..... | 91 |

| | | |
|----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 4.6.3 | Microscopia Eletrônica de Transmissão..... | 92 |
| 4.7 | Análise das propriedades nanomecânicas de neutrófilos por Espectroscopia de Força Atômica..... | 93 |
| 4.8 | Lise Celular e Extração Protéica..... | 94 |
| 4.9 | Dosagem de Proteínas das Amostras..... | 94 |
| 4.10 | Focalização Isoelétrica (IEF ou 1a Dimensão)..... | 95 |
| 4.11 | Etapa de Equilíbrio..... | 95 |
| 4.12 | Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)..... | 96 |
| 4.13 | Coloração..... | 97 |
| 4.14 | Digitalização e Secagem dos Géis..... | 97 |
| 4.15 | Análise Computacional das Imagens dos Géis..... | 98 |
| 4.15.1 | Análise Estatística..... | 100 |
| 4.16 | Digestão de spots protéicos..... | 101 |
| 4.17 | Espectrometria de Massa (MALDI-TOF)..... | 103 |
| 4.18 | Buscas em bancos de dados..... | 103 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 105 |
| 5.1 | Separação de células e exposição ao titânio | 105 |
| 5.2 | Teste de viabilidade celular com Nigrosina..... | 105 |
| 5.3 | Morfologia dos Neutrófilos..... | 107 |
| 5.3.1 | Microscopia de Luz | 107 |
| 5.3.2 | Microscopia de Varredura..... | 110 |
| 5.3.2.1 | Análise Elementar por Dispersão de Raios-X..... | 118 |
| 5.3.3 | Microscopia de Transmissão..... | 119 |
| 5.4 | Avaliação da Fagocitose..... | 124 |
| 5.4.1 | Microscopia de Luz..... | 124 |
| 5.4.2 | Videomicroscopia..... | 125 |
| 5.5. | Avaliação da ativação de Neutrófilos..... | 126 |
| 5.5.1 | Citometria de Fluxo | 126 |
| 5.5.2 | Teste do Nitroblue Tetrazolium- NBT..... | 131 |
| 5.6 | Espectroscopia de Força Atômica | 135 |
| 5.7 | Produção dos Géis Bidimensionais..... | 146 |
| 5.8 | Análise dos Géis | 147 |
| 5.9 | Identificação das Proteínas | 147 |
| 5.9.1 | Proteína 3-like (isoforma 2) relacionada a microfibrilas- MFA3L..... | 150 |
| 5.9.2 | Proteína Hsc70/Bag1 (estrutura cristalina), em complexo com ATP..... | 151 |

| | | |
|---------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 5.9.3 | Proteína TRIO e a proteína de ligação a F-actin..... | 152 |
| 6 | CONCLUSÕES | 153 |
| 7 | PERSPECTIVAS..... | 155 |
| 8 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 156 |
| ANEXOS | | |
| ANEXO A- | Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UNB | |
| ANEXO B- | Possível via metabólicas de fagocitose de NPs de TiO ₂ , mediada por αM2β (CD-11b) utilizadas pelos neutrófilos | |
| ANEXO C- | Possível via metabólica de fagocitose de agregados/aglomerados de TiO ₂ por integrinas FcγIII (CD-16) | |
| ANEXO D- | Artigo enviado para publicação na Revista BMC Biophysics | |
| ANEXO E- | Artigo a ser publicado após conclusão do doutorado | |
| ANEXO F- | Identificação protéica do spot 724- Proteína 3-like (isoforma 2) relacionada a microfibrilas- MFA3L | |
| ANEXO G- | Identificação protéica do spot 815-Proteína Hsc70/Bag1- (estrutura cristalina), em complexo com ATP | |
| ANEXO H- | Identificação protéica do spot 815- Proteína TRIO - | |

LISTA DAS FIGURAS

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 1- Rolamento, adesão fraca (selectinas), firme adesão (integrinas) e diapedese dos neutrófilos..... | 27 |
| Figura 2- Mecanismos de endocitose | 44 |
| Figura 3- Esquema de vias de apoptose por NPs de TiO ₂ | 59 |
| Figura 4- Característica da ativação do neutrófilo pelo NBT por microscopia de luz..... | 61 |
| Figura 5- Esquema de operação de um MFA..... | 65 |
| Figura 6- Deflexão do <i>cantilever</i> em função do movimento vertical da amostra..... | 66 |
| Figura 7- Delineamento experimental..... | 77 |
| Figura 8- Separação de neutrófilos..... | 80 |
| Figura 9- Câmara de Neubauer e seus quadrantes..... | 81 |
| Figura 10- Análise da viabilidade dos neutrófilos com nigrosina 0,05%..... | 82 |
| Figura 11- Nanopartículas de TiO ₂ em H ₂ O Milli-Q e imagens das NPs por MET..... | 83 |
| Figura 12- Controle da temperatura na platina do microscópio..... | 89 |
| Figura 13- Esquema geral do pareamento..... | 99 |
| Figura 14- Média ± erro padrão da viabilidade celular em cada tempo de medição para cada grupo..... | 106 |
| Figura 15- Análise da morfologia dos neutrófilos por microscopia de luz..... | 109 |
| Figura 16- Imagens de MEV da morfologia de neutrófilos controles e ativados por NPs deTiO ₂ | 115 |
| Figura 17- Presença de Glicocálice em neutrófilos ativados durante 5 minutos. | 116 |
| Figura 18- Imagens de MEV com neutrófilos ativados por NPs de TiO ₂ durante 30 minutos com extensões tubulovesiculares (citonemas), nanoporos e vesículas..... | 117 |
| Figura 19- Espectro obtido da análise elementar por RX de neutrófilos ativados por NPs de TiO ₂ | 118 |
| Figura 20- Imagens por MET de neutrófilos com 5 e 60 minutos de exposição a NPs de TiO ₂ | 122 |
| Figura 21- Imagens por MET de neutrófilos com 5 minutos de exposição a NPs de TiO ₂ | 123 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 22- Média \pm erro padrão da porcentagem de células com partículas fagocitadas nas condições Experimental e controle..... | 125 |
| Figura 23- Intensidade média de fluorescência (MFI) do marcador anti-CD 62L medida por citometria de fluxo..... | 127 |
| Figura 24- Intensidade média de fluorescência (MFI) por células do marcador anti-CD-11b medida por citometria de fluxo..... | 130 |
| Figura 25- NBT, média \pm erro padrão da porcentagem de células ativadas nas condições Experimental e Controle em cada um dos tempos avaliados..... | 133 |
| Figura 26- Imagens de neutrófilos controles e expostos a NPs de TiO ₂ , analisadas pelo teste do NBT..... | 134 |
| Figura 27- Resumo dos picos em relação a distribuição do diâmetro hidrodinâmico das NPs de TiO ₂ | 136 |
| Figura 28- Forças <i>snap in</i> calculadas a partir de curvas de espectroscopia de força medidas por AFM..... | 138 |
| Figura 29- Parâmetro maximum load force calculado a partir de curvas de espectroscopia de força medidas por microscopia de força atômica..... | 140 |
| Figura 30- Parâmetro Detach force calculado a partir de curvas de espectroscopia de força medidas por microscopia de força atômica..... | 141 |
| Figura 31- Parâmetro módulo de Young calculado pela análise de espectroscopia de força medida por microscopia de força atômica..... | 143 |
| Figura 32- Parâmetro Energia dissipada calculada por análise de espectroscopia de força e medida por microscopia de força atômica..... | 145 |
| Figura 33- Géis bidimensionais com 50 μ g de proteínas em pH ácido de 4-7..... | 146 |

LISTA DOS QUADROS E TABELAS

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 1. Quadro I- Características dos estágios de maturação dos neutrófilos..... | 23 |
| 2. Quadro II- Reagentes e soluções para montagem dos gradientes, tubos 15 mL..... | 79 |
| 3. Quadro III- Reagentes e soluções para montagem dos gradientes, tubos 50 mL..... | 79 |
| 4. Quadro IV- Marcadores e parâmetros utilizados nos experimentos. em Citometria de Fluxo | 85 |
| 5. Quadro V- <i>Spots</i> com abundância diferencial..... | 148 |
| 6. Quadro VI- Identificação protéica de neutrófilos por MALDI-TOF-TOF peptide mass fingerprinting. | 149 |
| 7. Tabela I- Número de spots detectados na condição normal e na condição titânio..... | 147 |

ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

| | |
|---------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ADN- | Ácido Desoxirribonucleico |
| ATP- | Adenosina trifosfato |
| ASTM- | International: American Society for Testing and Materials |
| Bcl-2- | Proteína anti-apoptótica |
| CAMs- | Moléculas de Adesão Celular |
| Ca ²⁺ - | íon Cálcio |
| C3b- | Fração do sistema complemento C3b |
| C5a- | Fração C5a do sistema complemento |
| CD-16- | Fc γ RIIIb- Receptor de porção Fc de IgG RIIIb..... |
| CFU-GEMM- | Colony Forming Unit – Granulócitos, Eritrócitos, Monócitos e megacariócitos-célula multipotencial comum |
| DLS | Dispersão Dinâmica da Luz (Dynamic Light Scattering) |
| DMSA | Ácido dimercaptosuccínico |
| DTT- | Ditiotreitol. |
| DHB- | Ácido 2,5 dihidroxibenzóico |
| 1-DE- | Eletroforese Unidimensional |
| 2-DE- | Eletroforese Bidimensional |
| EDTA- | Ácido etilenodiaminotetraacético. |
| ERO- | Espécies Reativas de Oxigênio |
| ERN- | Espécies Reativas de Nitrogênio |
| fMLP- | Formil Metionil Leucil Fenilalanina |
| G-CSF- | Fator de crescimento estimulador de colônia de granulócito |
| GMCSF- | Fator de crescimento estimulador de colônia de granulócito e macrófago |
| GRO α - | Genes Produto-alfa relacionados ao Crescimento |
| GRO β - | Genes Produto β relacionados ao Crescimento |
| GRO γ - | Genes Produto γ relacionados ao Crescimento |
| H ₂ O ₂ - | Peróxido de hidrogênio |
| HBSS- | Hank's Balanced Salt Solution |
| hCAP-18- | Catelicidina |
| HPLC- | Cromatografia Líquida |

| | |
|-----------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ICAM-1(CD45)- | Molécula de Adesão Intercelular, Antígeno associado à função dos linfócitos- 1 |
| IEF- | Focalização Isoelétrica |
| IgG- | Imunoglobulina G |
| IL-1 α - | Interleucina 1 alfa |
| IL-3- | Interleucina 3 |
| IL-8- | Interleucina 8 |
| IPG- | Gradiente imobilizado de pH |
| Kd- | <i>Kilodalton</i> |
| LDH- | Lactato desidrogenase |
| LFA-1($\alpha_L\beta_2$; CD11a/CD18) | Antígeno associado a função leucocitária 1 |
| LPS- | Lipopolissacarídeo |
| LTB ₄ - | Leucotrieno B ₄ |
| Mac-1 ($\alpha_M\beta_2$; CD11b/CD18) | Antígeno de macrófago 1 |
| MALDI- | Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Ionização/Dessorção de Matriz Assistida por Laser |
| MAPK- | Proteína cinase de ativação mitogênica |
| M.E.V.- | Microscopia Eletrônica de Varredura |
| M.E.T.- | Microscopia Eletrônica de Transmissão |
| MFI- | Intensidade Média de Fluorescência |
| Mg ²⁺ - | Magnésio |
| MIP 1 α - | Proteína Inflamatória de Macrófagos -1a -MMP-8- metaloproteases-8 |
| MMP-9- | Gelatinase |
| MMP-25- | Leucolisina |
| MPO- | Mieloperoxidase |
| Mn-SOD- | Manganês-Superóxido Dismutase |
| MS- | Espectrometria de Massa (<i>Mass Spectrometry</i>) |
| NADPH oxidase- | Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato |
| NaOH- | Hidróxido de sódio |
| NBT- | <i>Nitroblue Tetrazolium</i> |
| NETs- | Neutrophil Extracellular Traps |
| NGAL- | Lipocalina |
| Nramp-1- | Proteína de Macrófago associada a Resistência Natural |
| PHSC- | Pluripotencial Hematopoietic Stem Cell –Célula |

| | |
|-----------------------------|-----------------------------------------------------|
| | Tronco Pluripotencial Hematopoiética |
| PMF | <i>Peptide Mass Fingerprint</i> |
| PMN- | Polimorfonuclear |
| PMA- | 13-acetato de forbol éster 12-miristato |
| PTPC- | Poros de transição de permeabilidade na mitocôndria |
| FcγRI (CD64)- | Receptores com alta afinidade de ligação |
| RFc- | Receptores de opsoninas |
| TF- | Transferrina |
| TFA- | Ácido Trifluoracético |
| TiO ₂ - | Dióxido de Titânio |
| UV- | Ultravioleta |
| VDAC- | Canal dependente de voltagem |
| VLA-4(Very Late Antigen-4)- | β ₁ integrina |

RESUMO

O crescente uso de nanomateriais como dióxido de titânio (TiO₂) em seres humanos na área biomédica, cosmética, alimentícia entre outras, tem estimulado pesquisas sobre toxicidade pelo potencial risco à saúde humana. Alguns aspectos da resposta inflamatória ao titânio no organismo ainda não foram completamente elucidados. Sabe-se que a exposição celular a nanopartículas (NPs) de TiO₂ pode induzir estresse oxidativo que desencadeia uma cascata de eventos com sinalização celular, respostas inflamatórias, proliferativas e genotóxicas. Os neutrófilos (PMNs) representam a primeira linha de defesa celular imunológica do organismo, sendo ativados e rapidamente recrutados para as regiões onde as NPs de TiO₂ foram implantadas.

Este estudo teve como objetivo analisar as interações de neutrófilos humanos com NPs de TiO₂ *in vitro*, em diferentes tempos de exposição (1, 5, 30 e 60 minutos). A análise morfológica da interação foi obtida por microscopias de luz, eletrônica de varredura e de transmissão enquanto a espectroscopia de força atômica permitiu a análise das modificações mecânicas dos PMNs. A expressão de moléculas de adesão, CD-11b e CD-62L foi analisada por Citometria de Fluxo e o teste do Nitroblue tetrazolium (NBT) possibilitou a avaliação da produção de ânion superóxido pelos PMNs após incubação com NPs de TiO₂. A eletroforese bidimensional de extratos protéicos de neutrófilos quiescentes e ativados por TiO₂ no tempo 30 minutos permitiu a comparação de mapas proteômicos e a identificação de proteínas por PMF (*Peptide Mass Fingerprinting*).

As análises por microscopia de luz, de varredura e transmissão demonstraram que o fator tempo teve um efeito significativo sobre a capacidade de fagocitose e as alterações da morfologia dos PMNs. As análises de citometria de fluxo não demonstraram correlação entre as alterações morfológicas e do citoesqueleto e a expressão de moléculas de adesão (CD-11b e CD-62L). Ativação celular e produção de ânion superóxido foram demonstrados pelo teste do NBT ao longo do tempo. A espectroscopia de força atômica demonstrou aumento das forças de atração, de adesão bem como da rigidez, elasticidade e energia dissipada nos PMNs.

A análise comparativa dos géis bidimensionais resultou em 7 *spots* com diferença significativa de abundância ($p \leq 0,05$), dos quais 3 proteínas foram identificadas por *PMF*. Tais proteínas têm funções relacionadas à regulação da organização do citoesqueleto, fagocitose e ao ciclo celular. O presente estudo representa uma contribuição para o esclarecimento dos mecanismos fisiológicos celulares envolvidos na interação de nanomateriais com o organismo.

Palavras-chave: Neutrófilo, Dióxido de titânio, Morfologia, Proteômica, Citotoxicidade.

ABSTRACT

The increasing use of nanomaterials such as titanium dioxide (TiO₂) in humans in the biomedical, cosmetics, food and other fields, has stimulated the research on toxicity, due to the potential risk to human health. Some molecular aspects of the inflammatory response after implantation of titanium in the body has not yet been fully elucidated. It is known that the exposure of cells to nanoparticles (NPs) can induce oxidative stress that triggers a cascade of events resulting in cell signaling, inflammatory, proliferative and genotoxic responses. Neutrophils are the first line of cellular immunological defense and are quickly recruited to the titanium implantation areas.

The present study aimed to analyze the interactions of human neutrophils with TiO₂ NPs in vitro at different incubation times (1, 5, 30 and 60 minutes). The morphological characteristics of this interaction were analyzed by light, electron scanning and transmission microscopy, whilst atomic force spectroscopy allowed PMNs mechanical forces analysis. The expression of adhesion molecules, CD-11b and CD-62L, was analyzed by Flow Cytometry and the Nitroblue tetrazolium (NBT) test enabled the evaluation of superoxide anion production by PMN after incubation with TiO₂ NPs. The two-dimensional electrophoresis of protein extracts from quiescent and TiO₂ activated neutrophils after 30 minutes of incubation allowed the comparison of proteomic maps and protein identification by PMF (Peptide Mass Fingerprint).

Light, scanning and transmission microscopies results showed that the time factor had a significant effect on PMNs phagocytosis and morphology changes. Flow cytometry analysis showed no correlation between adhesion molecules expression (CD-11b and CD-62L) and morphological alterations. The NBT test demonstrated PMNs activation and superoxide anion production after exposure to TiO₂ NPs. Moreover, atomic force spectroscopy demonstrated increased parameters for attractive and adhesion forces, stiffness, elasticity and dissipated energy in PMNs along the time course.

The comparative analysis of two-dimensional gels resulted in 7 spots with statistically significant abundance ($p \leq 0.05$), among which 3 proteins were identified by PMF. The identified proteins are related to the regulation of cytoskeleton organization, phagocytosis and cell cycle. This study represents a contribution to the elucidation of the physiological mechanisms involved in cellular interactions of nanomaterials with the body.

Keywords: Neutrophil, Titanium Dioxide, Morphology, Proteomics, Cytotoxicity

1 INTRODUÇÃO

A necessidade de se encontrar materiais que apresentem biocompatibilidade com o organismo humano levou ao interesse científico pela pesquisa de biomateriais, uma vez que o principal objetivo do uso de implantes é a restauração das funções dos tecidos naturais e órgãos do corpo humano (FAZANO, 1980, ARORA, 2010). Um dos primeiros materiais empregados na confecção de próteses para implantes foi o titânio (BOTHE; BEATON; DAVENPORT, 1940). Trata-se de um metal de transição leve na tabela periódica de elementos químicos, com massa atômica de 47,9 u, de cor branca metálica, sólido na temperatura ambiente, apresentando como características a alta relação resistência/peso, boa resistência à corrosão (DONACHIE, 1988) e elevada biocompatibilidade (FRISKEN et al., 2002).

Esse metal pode ser encontrado na água, no ar e no solo, entrando no organismo humano eventualmente pela dieta (ex: dióxido de Ti presente em corantes artificiais em biscoitos, bolachas) ou ocupacional pela via respiratória em ambientes de exploração do metal (SCHROEDER et al., 1963) ou ainda como órteses e próteses orgânicas. Esse metal apresenta-se em três formas minerais (cristais): anatase, brookita e rutilo sendo utilizado em larga escala na área biomédica (ALBREKTSSON, 1985), (SOLAR et al., 1979; WITT; SWANN, 1991) (CHOUDHARY et al., 2007; HASEGAWA; INAGAKI; HARAGUCHI, 2001).

Ele é utilizado em larga escala como material bruto, micro e nanoparticulado, na indústria automotiva, aeroespacial e de alimentos (tintas, filtros solares, cerâmicas, aditivos em corantes farmacêuticos e alimentícios), (PHILLIPS; BARBANO, 1997). Na área biomédica tem aplicabilidade na confecção de implantes dentários (ALBREKTSSON, 1985; BRANEMARK, 1983), telas, placas e parafusos maxilofaciais e próteses ortopédicas (SOLAR; POLLACK; KOROSTO, 1979) além de próteses cardiovasculares (CHOUDHARY; HABERSTROH; WEBSTER, 2007). Adicionalmente, esse metal tem sido aplicado em terapias antineoplásicas na forma de nanopartículas (ZHANG; SUN, 2004). Por sua vez, o dióxido de titânio em nanopartículas também pode ser utilizado na clivagem proteínas no sítio do aminoácido prolina (JONES et al., 2007) e para purificação de peptídeos fosforilados utilizando micro-colunas de dióxido de titânio (TiO_2) com ácido dihidroxibenzoico (DHB), acetonitrila e ácido trifluoracético (TFA) para análises em espectrometria de massa (LARSEN et al., 2006).

Apesar do uso sistemático desse metal em várias áreas, constata-se que a resposta inflamatória bem como o processo de cicatrização após a implantação do titânio no organismo ainda não foi completamente elucidada (NYGREN; ERICKSSON; LAUSMAA, 1997). O TiO_2 promove uma resposta a corpo estranho com a presença de células inflamatórias (CHOUDHARY et al., 2007; ERIKSSON; NYGREN, 2001a), observando-se na sequência fisiológica uma cicatrização na área onde o material foi implantado (BRANEMARK, 1983). Assim, há uma cadeia de eventos celulares e fisiológicos que provavelmente interagem quando o TiO_2 está em contato com os tecidos humanos (ERIKSSON; NYGREN, 2001b; WALIWAARA et al., 1996). Quando o metal bruto é implantado no organismo poderá ocorrer a dissolução passiva /corrosão, com liberação de íons e nanopartículas (NPs) no meio biológico. Esses íons e NPs de titânio podem difundir-se localmente (metalose) e ainda podem alcançar células, tecidos e órgãos como linfonodos, baço, medula óssea, fígado, rins e coração (GAO et al., 2011; OKUDA-SHIMAZAKI et al., 2010). Apesar dos relevantes estudos já realizados, ainda não se conhece completamente a biocinética e biodistribuição do metal e os efeitos a longo prazo no organismo (CASE et al., 1994; SARMIENTO-GONZALES et al., 2009; SCHROEDER; TIPTON, 1963; SMITH et al., 1997). Por outro lado, o crescente uso de materiais e substâncias nanoparticuladas com TiO_2 tem sido motivo de preocupação na comunidade científica pelo seu potencial risco de toxicidade e genotoxicidade. Isso levou à prática da remoção, de placas e parafusos de titânio em pacientes em um segundo tempo cirúrgico (JORGENSEN et al., 1999; JORGENSEN et al., 1997; LANGFORD; FRAME, 2002).

Sabe-se que partículas e nanopartículas de TiO_2 podem penetrar as células fagocitárias e as não fagocitárias (BUSCH et al., 2011; TAMURA et al., 2004; VAMANU et al., 2008), potencializando o risco à toxicidade por estresse oxidativo e pelo acesso direto às proteínas intracelulares, organelas e ao ácido desoxirribonucléico (ADN), (GEISER et al., 2005 ; LI et al., 2003). Os neutrófilos, representam a primeira linha imunológica de defesa celular do organismo e são rapidamente recrutados para as áreas onde as nanopartículas e partículas de TiO_2 são implantadas nos tecidos, interagindo com esse metal (ERIKSSON; LAUSMAA; NYGREN, 2001).

1.1 Titânio e Biocompatibilidade

Duas características básicas necessárias aos metais utilizados para implantes em seres vivos são: biocompatibilidade e resistência à dissolução passiva (corrosão). O termo biocompatibilidade pressupõe que a aplicação clínica de um biomaterial não cause reações adversas, tóxicas ou carcinogênicas ao organismo (KLINKMANN; WOLF; SCHMITT, 1984). Esses aspectos, podem ser analisados pela resposta local (interposição de tecido conjuntivo, hiperemias) ou sistêmica do hospedeiro (reações a corpo estranho e alergênicas), (SOLAR et al., 1979). O titânio é utilizado há vários anos na área biomédica pela sua biofuncionalidade (BOTHE et al., 1940), que é a capacidade de um dispositivo funcionar com resposta apropriada ao hospedeiro em uma aplicação específica (BOSCHI, 1996). Como já enfatizado, o titânio puro exhibe características interessantes como alta relação resistência/peso, boa resistência à corrosão e elevada biocompatibilidade, o que o torna apropriado para aplicações em implantes no corpo humano (FRISKEN et al., 2002).

Apesar de ser considerado inerte e ocorrer sua integração no organismo (NYGREN et al., 1997) alguns estudos demonstraram que partículas e nanopartículas de titânio podem atingir outros órgãos após a inserção de implantes em organismos vivos (FRISKEN et al., 2002; URBAN et al., 2000). Citam-se ainda a impregnação de tecidos humanos próximos ao implante com depósitos enegrecidos extracelulares (SCALES, 1991) e a presença de partículas do metal no interior de histiócitos, células gigantes (WITT; SWANN, 1991) e neutrófilos (CALLAGHAN; ROSENBERG; RUBASH, 2007; CHEN et al., 1999), além de apresentar superfícies com grande reatividade (LARSEN et al., 2006). Uma das primeiras interações das nanopartículas de TiO_2 no organismo ocorre com as proteínas plasmáticas as quais desempenham um importante papel no reconhecimento de corpos estranhos que entrem na circulação. As proteínas plasmáticas que adsorvem na superfície das nanopartículas potencialmente determinam a biocinética desses materiais e seu destino *in vivo* (DENG et al., 2009). Essas proteínas já foram identificadas interagindo com NPs de TiO_2 , como imunoglobulinas, lipoproteínas, proteínas de fase aguda, proteínas ligadas as vias de complemento e da coagulação sanguínea (DENG et al., 2009). Por exemplo, foi demonstrado que a adesão da transferrina

(TF) do soro humano é maior ao titânio que ao Ferro III e que essa interação é importante para a atividade migratória de íons e nanopartículas de TiO_2 liberados por implantes, reagentes imagiológicos e drogas anticancerígenas (TINOCO; VALENTINE, 2005). Essas ligações muito estáveis com a transferrina sérica conferem a titanocenos propriedades antineoplásicas pois permitem sua entrada nas células, onde, ao atravessar a membrana plasmática serão reduzidas por um gradiente de prótons a Ti(III) , ligando-se aos fosfatos carregados negativamente ou aos átomos de azoto das bases de ADN, causando morte celular ou pelo mecanismo de inibição da proteína cinase C (PKC) responsável pelo bloqueio pré-mitótico (BENITE; MACHADO; BARREIRO, 2007; RICHARDSON, 2002). A aplicação da propriedade dos titanocenos de ligar-se ao fosfato da cadeia de ADN, promovendo sua ruptura, permite a conjugação desse metal em complexos heterometálicos (Pt-Ti) com potencial anticâncer (BERARDINI; ENGE; BRENAN, 1993; CHRISTODOULOU et al., 1998; MOHAN et al., 1987; VALADARES; KLEIN; QUEIROZ, 1996). Por outro lado, e de forma preocupante, estudos em ratos demonstraram que nanopartículas de TiO_2 podem causar danos as cadeias de ADN de células não humorais, sugerindo que a exposição crônica de seres humanos a essas partículas levaria a desordens genéticas e risco de câncer. Em consequência, o dióxido de titânio (nanopartículas) foi classificado pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer como carcinógeno humano grupo 2B em 2006 (IARC, 2006;2010).

Estima-se que cerca de 2 milhões de toneladas de TiO_2 sejam produzidas por ano em todo o mundo. Além de implantes, tintas, cosméticos, filtros solares e vitaminas, as nanopartículas podem ser encontrados em pasta de dentes, alimentos, suplementos nutricionais, e centenas de outros produtos de cuidados pessoais. Quando coloca-se em questão o potencial risco de inflamações e neoplasias, essa interação ganha grande relevância, especialmente para as pessoas expostas ocupacionalmente a concentrações elevadas de nanopartículas de TiO_2 . Isto pode ser correlacionado com a trágica questão do amianto (asbestos) e do mercúrio e os já conhecidos resultados negativos para saúde pública em todo o mundo (YAZDIA et al., 2010).

Assim, a biocompatibilidade e toxicidade das partículas e nanopartículas de TiO_2 dependem de um grande número de fatores: do meio ambiente, do indivíduo e do metal (dimensões, forma das partículas, a sua área superficial específica, a

concentração, a polidispersibilidade) e diversos parâmetros do meio (pH, concentração iônica, composição, etc.), (JIANG; OBERDORSTER; BISWAS, 2008; PEREIRA, 2010).

1.2 Granulopoiese de neutrófilos

Embora os neutrófilos sejam chamados comumente de granulócitos, esse termo inclui também os granulócitos eosinofílicos (eosinófilos) e os granulócitos basofílicos (basófilos). A granulopoiese dá origem aos neutrófilos, eosinófilos e basófilos, ou seja, aos leucócitos que têm grânulos específicos no citoplasma. Começa a partir da mesma célula pluripotencial, (*PHSC*), que origina a célula multipotencial comum (*CFU-GEMM*), a qual se divide em três tipos de Unidade Formadora de Colônias (*Colony Forming Units*), uma para os basófilos, outra para os eosinófilos e outra que dá origem a uma CFU bipotencial, pois origina a colônia de granulócitos, formadora de neutrófilos (*G-CSF*) e a colônia precursora dos monócitos (OPPENHEIM; SHEVACH, 1990; SÖHNLEIN, 2008). Os neutrófilos são produzidos na medula óssea, onde necessitam, em média, duas semanas para completar a fase de maturação. A medula óssea não é apenas o local de produção de neutrófilos, mas também de grande armazenamento celular com aproximadamente 20 vezes mais a quantidade dessas células presentes do que na circulação (KUIJPERS ; ROOS, 2001). A medula óssea é distribuída no interior de vários ossos no organismo e pesa aproximadamente 2600 g (~4.5 % do peso de um adulto normal) e estima-se que ~60% das células nucleadas sejam neutrófilos em diferentes estágios de maturação (MOLLINEDO, 2003).

A maturação dos PMNs está dividida em 6 estágios dependente do tamanho da célula, morfologia nuclear e conteúdo dos seus grânulos: mieloblastos, promielócitos, mielócitos, metamielócitos, bastonetes e neutrófilos polimorfonucleares (ou segmentados). Os grânulos neutrofilícos são formados a partir do estágio de promielócitos jovens, quando vesículas de transporte imaturas germinam do complexo de Golgi. Os grânulos que apresentam alto conteúdo de mieloperoxidase foram chamados de *peroxidase-positivo* ou grânulos azurofílicos pela afinidade ao corante básico azure A, ou simplesmente designados grânulos

primários. A partir do estágio de mielócitos, quando cessa a produção de mieloperoxidase, os grânulos peroxidase negativos são preponderantes e dividem-se em grânulos específicos (secundários) e grânulos de gelatinase (terciários). O conteúdo de grânulos e vesículas secretórias de neutrófilos está descrito na revisão feita por Teles (TELES, 2005).

Durante a maturação dos PMNs, além da formação de seus grânulos, observa-se uma série de alterações funcionais. Os neutrófilos imaturos possuem muitas mitocôndrias e parecem utilizar a respiração para a síntese de proteínas. A medida que ocorre a maturação os PMNs utilizam a glicólise como fonte primária de energia para síntese protéica. Entretanto as mitocôndrias também estão presentes no neutrófilo maduro, onde desempenham importante papel na regulação da apoptose (FOSSATI et al., 2003; MOLLINEDO, 2003). A maturação dos neutrófilos é influenciada por fatores como IL-1, IL-3, GM-CSF e G-CSF atuando diretamente na cinética de produção dessas células (EDWARDS, 2005; JANEWAY; TRAVERS; WALPORT, 2000).

Os grânulos que existem dentro do neutrófilo constituem reserva de proteínas antimicrobianas, proteases, e componentes do complexo NADPH oxidase, e de um vasto grupo de receptores, ligados à membrana, para moléculas de adesão ao endotélio, proteínas do tecido conjuntivo, produtos bacterianos, e mediadores solúveis da inflamação (FAURSCHOU; BORREGAARD, 2003). Dessa forma, o número de neutrófilos circulantes é determinado pela sua taxa de liberação da medula óssea e não pela sua taxa de produção celular (ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2005). Os neutrófilos sanguíneos maduros são altamente especializados, com um curto tempo de vida e não apresentam divisão celular.

1.3 Cinética da Produção dos Neutrófilos

Na cinética de formação e ação dos neutrófilos, essas células passam por vários compartimentos anatômicos e funcionais: 1) compartimento medular de formação 2) compartimento medular de reserva 3) compartimento circulante 4) compartimento de marginalização (JUNQUEIRA, 2005). Considera-se ainda o tecido conjuntivo como um quinto compartimento, onde permanecem por quatro a seis dias e então ocorre a apoptose seguida pela remoção dos restos celulares por macrófagos (PAROLIN; REASON, 2001). Em condições normais, os neutrófilos são produzidos na medula óssea por células tronco CD34⁺, estimando-se uma taxa diária de 5×10^{10} de células, representando uma das taxas mais rápidas em volume de produção no corpo humano (GONÇALVES; CHIASSON; GIRARD, 2010).

Concluída sua produção, os neutrófilos são liberados para o sangue dois dias após sua completa maturação. Sua distribuição no sangue periférico se dá em dois compartimentos, circulante e marginado, cada um com a mesma magnitude e há intercâmbio constante entre eles. Essas células representam os principais tipos de leucócitos encontrados no sangue periférico, com uma meia-vida curta na circulação de apenas seis a dez horas. Estudos com radioisótopos demonstraram que o desaparecimento dos neutrófilos da circulação é aleatório e não por senescência (BIER, 1990; KUIJPERS ; ROOS, 2001).

Da circulação essas células podem migrar para os tecidos, sendo recrutadas a um sítio de inflamação, seguindo um gradiente de quimiocinas específicas, onde permanecem ativas por dois até seis dias (BURG, 2001). Uma vez nos tecidos, os neutrófilos não retornam para a corrente sanguínea (fluxo unidirecional). Os neutrófilos representam a primeira linha de defesa celular do sistema imune inato em função de suas ações antimicrobianas e fagocitárias e pelo seu rápido recrutamento para o sítio inflamatório (JANEWAY et al., 2000; STITES, 2000).

1.4 Marginação e Diapedese dos Neutrófilos

O recrutamento dos neutrófilos para o sítio inflamatório ocorre em uma cascata de eventos, dependente do gradiente de concentração quimiotático, sendo essas as primeiras células de defesa a migrar do sangue para o sítio quimiotático e se apresentarem com um armamento especializado de combate aos agentes infecciosos (BABIOR, 1984; SANTOS, 2007). Quatro etapas podem ser caracterizadas durante a migração transendotelial: a) marginação (posição periférica), b) captura e rolamento (adesão transitória ao endotélio), c) adesão (firme união ao endotélio vascular) e d) diapedese (passagem pelo endotélio para o parênquima tissular), (SIMON; GREEN, 2005), (Figura 1).

Em condições normais, os elementos figurados do sangue circulam no centro da corrente e o fluido circula em contato com o endotélio (GANE; STOCKLEY, 2011; GOLDSBY et al., 2002). Dessa forma o aumento da permeabilidade vascular associado à dilatação do leito capilar e venoso, além de outros fatores como o aumento da adesividade das plaquetas e a hemoconcentração, colaboram para um progressivo retardo da circulação na área inflamada (ZAGO et al., 2005). Além disto, durante a inflamação as células passam a circular por todo o volume vascular, facilitando o contato dos neutrófilos com as células endoteliais (rolamento e fraca adesão) mediado por selectinas (KANG, 2006; ZARBOCK; LEY, 2008).

A migração para a área inflamada ocorre direcionada por agentes quimiotáticos que são produtos de origem variada cuja ação resulta em marginação, pavimentação e diapedese de leucócitos para o tecido inflamado (JANEWAY et al., 2000; PARHAM, 2001). São agentes quimiotáticos os fragmentos do sistema complemento ativado (C5a, C3a, C3b); fatores derivados do sistema fibrinolítico, sistema cininas (calicreína, bradicinina); produtos de leucócitos, endotélio e plaquetas (óxido nítrico, leucotrieno, prostaglandina PAF- Fator de Agregação de Plaquetas); produtos de determinadas bactérias (fLMP, LPS) e citocinas (IL-1, IL-6, IL-8, IL-11, IL-12, TNF), (ALBELDA; SMITH; WARD, 1994; CASSATELLA, 1995). Por sua vez, as citocinas também agem nas células endoteliais próximas à região com processo inflamatório induzindo um aumento da expressão de moléculas de adesão (CAMs), deixando esse epitélio em um estado de ativação (CASSATELLA et al., 1999; GOLDSBY et al., 2002).

Durante o rolamento na superfície endotelial de vasos pós-capilares, ocorre uma interação fraca, de baixa afinidade, entre selectinas (glicoproteínas mucinas) do

neutrófilo como a glicoproteína transmembrana L-Selectina PSGL-1, localizada em *lipid rafts* que são microdomínios membranares lipídicos associados a vias de sinalização celular, com selectinas das células endoteliais, P-Selectina e E-Selectina e com ICAM-1 (CASSATELLA et al., 1999). Por outro lado, na ausência de sinais inflamatórios essa ligação se rompe pela força do fluxo sanguíneo e a célula continua circulante. Mas quando há um estímulo inflamatório, essas interações fracas são estabilizadas pelas ligações de integrinas com as ICAMs endoteliais, facilitando a diapedese (ZARBOCK; LEY, 2008).

A ligação de quimiocinas ou outros quimiotáticos a receptores de membrana de neutrófilos induz uma mudança conformacional em proteínas da família das integrinas, aumentando sua afinidade por moléculas de adesão intercelular (ICAMs) situadas no endotélio. As ligações dependentes de ativação das β_2 integrinas (Mac-1, LFA-1) dos neutrófilos aos seus ligantes endoteliais (ICAM-1) convertem as interações transitórias do rolamento em firme adesão (CAREY; CHAREST; KING, 2011; DUNNE et al., 2002). A família das integrinas possui duas subunidades α e β , mas existem 16 tipos de subunidades α e 8 tipos de subunidades β constituindo mais de 20 receptores conhecidos. Na adesão firme dos PMNs ao endotélio há a participação de duas integrinas: antígeno de macrófago 1 (Mac-1; $\alpha_M\beta_2$; CD11b/CD18) e antígeno associado à função dos linfócitos 1 (LFA-1; $\alpha_L\beta_2$; CD11a/CD18), (ALBELDA et al., 1994; ZHANG; WOJCIKIEWICZ; MOY, 2002). Os PMNs também podem expressar β_1 integrina (VLA-4) e ligar-se à VCAM-1 do endotélio (BURG, 2001; SÖHNLEIN, 2008; WAGNER; ROTH, 2000).

Um aspecto importante a ser ressaltado quanto ao rolamento é que o influxo de cálcio intracelular desempenha um papel essencial para a polarização e adesão dos neutrófilos via selectinas e integrinas. Durante o rolamento dos neutrófilos o fluxo de cálcio intracelular em neutrófilos aumenta de forma dependente de forças de cisalhamento, medeia a transição entre a firme adesão por integrinas e a sinalização para a polarização do citoesqueleto (SCHAFF et al., 2008). Abolir o influxo de cálcio através da membrana celular inibe a ativação da integrina β_2 e conseqüentemente impede a adesão ao endotélio. Sabe-se ainda que o aumento do íon cálcio citoplasmático é um fator primordial para a transdução da resposta dos neutrófilos às quimiocinas (SCHORR et al., 1999).

O evento posterior à adesão firme é a diapedese (migração dos PMNs entre as células endoteliais) e a transmigração (movimentação dos neutrófilos na matriz

extracelular). A migração é mediada pela molécula de adesão de plaquetas e células endoteliais 1 (PECAM-1; CD31) e ICAMs (APLIN et al. (1998); (BURG, 2001). Os neutrófilos se aplainam sobre o endotélio, resultando em um aumento do contato e formação de um grande número de pontes de ligação por essas integrinas. A seguir, os neutrófilos sofrem alterações na sua forma, permitindo que eles passem entre as junções interendoteliais, migrando para o espaço tissular extra vascular e para os sítios inflamatórios (ZEN; PARKOSC, 2003). As vias de migração transendotelial CD-18-dependente (integrina $\beta 2$, Mac-1 e LFA-1) e CD18-independente (integrina $\beta 1$ e VLA-4) podem contribuir mutuamente para adesão e migração de leucócitos no pulmão em modelo animal em inflamação induzida por fluídos magnéticos recobertos com ácido dimercaptosuccínico (DMSA), (VALOIS, 2006).

Após a diapedese, os neutrófilos estimulados migram em direção a um gradiente de substâncias quimiotáticas pela liberação de proteases, abundância de proteínas e emissão de pseudópodes (AQUINO, 2008; GALKINA et al., 2012; GANE; STOCKLEY, 2011). Nesse aspecto a proteína Cdc 42 pertencente a família Rho-GTPase está relacionada com a polaridade celular (ETIENNE-MANNEVILLE, 2004; WELLS, 2006) sendo ativada em resposta a integrinas e bradicinina em células de mamíferos regulando adesão e permeabilidade celular (BROMAN, 2007; YANG, 2007). Cdc 42 regula a polimerização da actina e induz a formação de filipodias (ETIENNE-MANNEVILLE, HALL, 2003; HEASMAN, 2008), preparando a célula para o processo de fagocitose.

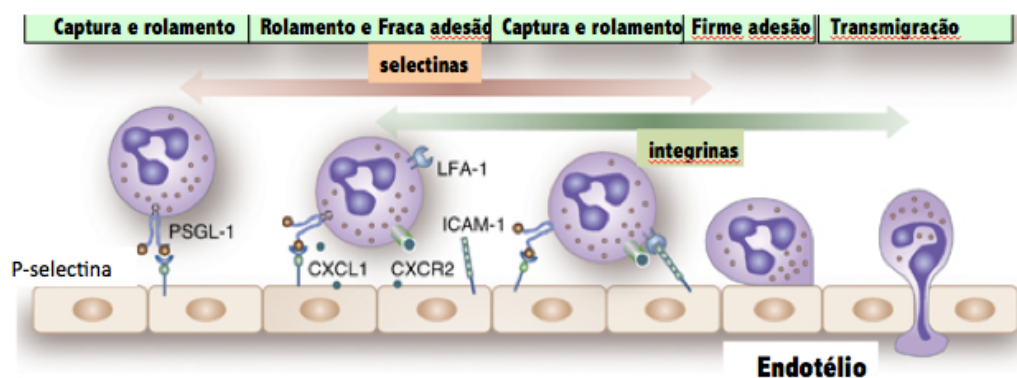


Figura 1- rolamento, adesão fraca (selectinas), firme adesão (integrinas)

e diapedese dos neutrófilos (modificado de Pindjakova and Griffin, 2011)

(PINDJAKOVA; GRIFFIN, 2011).

1.5 Fagocitose

Ao atingir o sítio inflamatório, inicia-se no neutrófilo o processo de fagocitose de microorganismos invasores ou de corpos estranhos como partículas ou agregados de NPs de TiO₂. Essa capacidade fagocitária dos neutrófilos é influenciada por vários fatores como medicamentos (MUNIZ-JUNQUEIRA et al., 2003), condições sistêmicas (MUNIZ-JUNQUEIRA et al., 2005) ou locais (CARNEIRO et al., 2012). Os fagócitos são equipados com receptores especializados que reconhecem seus alvos e iniciam os mecanismos de degradação, culminando com a morte e liberação de partículas lisadas. Essas células podem fagocitar partículas opsonizadas ou não opsonizadas (BEUTLER, 2004) sendo que os principais receptores de opsoninas (RFc) ligam-se a imunoglobulinas, na porção Fc, além do subgrupo de β 2-integrinas que se liga a partículas ativadas pelo complemento (OPPENHEIM; SHEVACH, 1990). Os receptores Fc γ levam à fosforilação e subsequente ativação de tirosina cinases das famílias Src e Syk, que se associam a um motivo *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*-ITAM, situado nas subunidades dos receptores Fc γ . As tirosinas cinases ativadas, fosforilam o motivo ITAM e outros substratos que levam a um aumento na concentração de cálcio intracelular, reorganização do citoesqueleto e ativação transcricional (LEE, HARRISON, GRINSTEIN, 2003). O receptor Fc γ R111b, em neutrófilos, pode se mover rapidamente durante a ativação dessa célula no disparo do processo de fagocitose. A ligação de partículas opsonizadas a um receptor Fc eleva a concentração de tais receptores ao redor da área de contato, e as células aumentam as microvilosidades e estendem seus pseudópodes em volta da partícula mediada pelas proteínas Cdc 42 e Rac 1, formando um canal que se funde, originando uma vesícula (fagossomo), (Fagocitose tipo I), (LEE, HARRISON, GRINSTEIN, 2003; OPPENHEIM; SHEVACH, 1990).

O neutrófilo ao ligar-se ao patógeno opsonizado ou a corpo estranho como as NPs de TiO₂ pode desencadear dois outros processos: a geração de compostos reativos de oxigênio, através do complexo NADPH oxidase e a liberação do conteúdo granular para o fagossomo (BABIOR, 1984; 1999). A composição inicial de um fagossomo não é ainda microbicida e o termo maturação se refere ao processo pelo qual o fagossomo adquire competência para destruir e eliminar partículas

internalizadas. Esse fenômeno é um processo dinâmico que inclui a aquisição de enzimas microbidas, ATPases vacuolares, importantes para a diminuição do pH e a montagem do complexo NADPH oxidase (BABIOR, 1984; SEGAL; ABO, 1993). Em neutrófilos, o fagossomo adquire capacidade antimicrobiana quando se funde com as vesículas secretórias e grânulos. Essas organelas contêm um poderoso arsenal de peptídeos antimicrobianos, enzimas proteolíticas e proteínas de membrana que contribuem para a eliminação do patógeno (MOLLINEDO, 2003 ; SEGAL, 2005). Nesse processo, elevados níveis de cálcio citossólicos são detectados durante a secreção de grânulos e a fagocitose (SCHAFF et al., 2008). Por outro lado, a polimerização da actina durante a fagocitose dependente de integrina $\alpha M\beta_2$ é regulada pela atividade da proteína RhoA, necessitando estímulo extracelular (ex.: citocinas, LPS, TNF, PMA) e as partículas que são ligadas a integrina $\alpha M\beta_2$ não induzem a formação de pseudópodes (fagocitose tipo II), (CARON; HALL, 1998). Ademais, a formação de extensões tubulovesiculares (nanotubos, citonemas) em neutrófilos tem sido pesquisada como uma nova ferramenta para ligação intercelular e apreensão de partículas para fagocitose mediada fundamentalmente por óxido nítrico endógeno ou exógeno (GALKINA et al., 2009).

1.6 Apoptose de neutrófilos

O termo apoptose (do grego após = separação, ptôsis = queda), adotado pela primeira vez por KERR et al., (1972), designa a forma fisiológica de morte celular que ocorre segundo programa genético que desencadeia processo de autodigestão controlada, em consonância com a remoção de células lesadas ou senescentes, sem alteração do microambiente celular (KERR; WYLLIE; CURRIE, 1972).

Na inflamação o processo de apoptose é retardado com acúmulo de fator de estimulação de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e Fator de estimulação de colônias de granulócitos (G-CSF), dessa forma o neutrófilo realiza a migração, desgranulação e fagocitose, e só então inicia-se o processo de apoptose, com o aparecimento de vesículas apoptóticas (apoptossoma) e a externalização da fosfatidilserina e fagocitose das vesículas apoptóticas pelos macrófagos. O correto controle da apoptose nos neutrófilos é de vital importância para renovação dos neutrófilos circulantes, para eficiência na remoção dos agentes patogênicos e na

regulação da resposta inflamatória (SIMON, 2003). A apoptose pode ser ativada por duas vias distintas: a intrínseca e a extrínseca. Na via intrínseca, os agentes indutores da apoptose levam à formação de poros de transição de permeabilidade na mitocôndria (PTPC), dependentes de voltagem (VDAC) e pela adenina nucleotídeo translocase (ANT), além de diversas proteínas da família da Bcl-2 que disparam o processo (KROEMER, 2002). O citocromo c é uma das principais moléculas extravasam pelos poros de transição (Hussain et al, 2010). A via extrínseca ou dos receptores de morte estabelece conexões com o meio extracelular, recebendo sinalização pró-apoptótica do exterior e de células vizinhas. Duas famílias de receptores estão envolvidas: Fas e TNF. As células que sofrem apoptose apresentam alteração no potencial transmembrânico mitocondrial, que precede a ativação de caspases e endonucleases (MAYER; OBERBAUER, 2003). Essas vias indutoras de apoptose comunicam-se permitindo a amplificação do sinal apoptótico sendo que ambas convergem para a ativação da caspase 3 (BAETU, 2002; REN, STUART, LINDBERG , ROSENKRANZAR, CHENY, 2001). Neutrófilos ativados entram em apoptose espontânea e, nas fases tardias da apoptose apresentam o fenômeno conhecido como “evanescência”, que é a eliminação completa do núcleo (REN, STUART, LINDBERG, ROSENKRANZAR, CHENY, 2001).

Um outro mecanismo, descoberto há menos de uma década, tem sido pesquisado em relação à apoptose. PMNs ativados lançam uma rede contra patógenos (NETs-neutrophil extracellular traps), formadas rapidamente (10 minutos) após a ativação de neutrófilos com PMA, IL-8, LPS e fungos (BRINKMANN; REICHARD; GOOSMANN, 2004). Estruturalmente, as NETs correspondem a uma rede de fibras formadas essencialmente por cromatina (DNA e nucleoproteínas), que também utiliza NADPH oxidase, proteínas e enzimas de grânulos azurofílicos, como a elastase e mieloperoxidase de neutrófilos, aderidas às fibras de cromatina-histona. As NETs envolvem, desarmam e matam os patógenos independente de fagocitose (BRINKMANN et al., 2004) ou por outro lado servem como barreira física para disseminação dos microorganismos (MCCORMICK et al., 2010). *Candida albicans* (URBAN, REICHARD, BRINKMANN, ZYCHLINSKY, 2006), *Aspergillus fumigatus* (MCCORMICK et al., 2010) e *Plasmodium falciparum* (BAKER et al., 2008) também induzem a formação de NETs de neutrófilos. Além dessas estruturas serem observadas nos tecidos combatendo bactérias e fungos também podem ser

observadas no interior de vasos sanguíneos durante sepse onde são reguladas por plaquetas (BAKER et al., 2008; CLARK et al., 2007). A produção de NETs requer a participação de enzimas, receptores de superfície e a reorganização do citoesqueleto dos neutrófilos (NEELI et al., 2009)

Embora a NETosis seja diferente da apoptose (a forma clássica de morte celular), as experiências recentes indicam uma ligação entre NETosis e autofagia. A implantação regulada de redes pode exigir modificações covalentes de histonas, que organizam cromatina no núcleo da célula e nas NETs (NEELI; RADIC, 2012).

1.7 Neutrófilos em contato com superfícies de titânio

Os PMNs apresentam comportamentos diferentes frente a macropartículas, micropartículas e nanopartículas. Nesse contexto as macroestruturas ou macropartículas correspondem a implantes, placas e telas dentre outros, de TiO_2 , enquanto as micropartículas têm uma dimensão maior que 100-200 nm e as nanopartículas < 100 nm (VAMANU et al., 2008; WATARI et al., 2009; GONÇALVES et al., 2010).

O aumento da área de superfície específica (área de superfície por unidade de volume) em determinado material provoca o aumento da dissolução iônica e toxicidade. O tamanho dos materiais biocompatíveis e não solúveis como TiO_2 guarda relação direta com o tamanho crítico para a transição do seu comportamento de interação biológica entre as partículas, tecidos e células : 10 μm , 100 μm e 100-200 nm. Como exemplo, a expressão de citocinas aumenta em razão direta com a diminuição do tamanho das partículas em neutrófilos. Quando acima de 10 μm o comportamento é bioinerte mas, quando abaixo de 10 μm (menores que neutrófilos) tornam-se biointerativos havendo indução de fagocitose pelas células e inflamação nos tecidos. Abaixo de 200 nm o estímulo decresce e as partículas não são detectadas pelo sistema imune, podendo invadir o organismo (WATARI et al., 2007, 2009). Deve-se considerar ainda outras classificações quanto as mensurações das nanopartículas (ex: lábeis, insolúveis), (DURAN et al., 2006)

1.7.1 Macropartículas

A cinética do recrutamento e adesão dos PMN a superfícies de Ti (placas ou implantes) demonstra que o titânio não se incorpora passivamente ao organismo.

Após implantação no organismo o biomaterial entra em contato com sangue ocorrendo adsorção de proteínas plasmáticas na sua superfície como cininogênio de alto peso molecular, fator XII, fibrinogênio, IgG, pré-callicreína, callicreína e C1q (WALIWAARA et al., 1996). Decorridos cinco a dez segundos as plaquetas são encontradas na superfície do metal e após dez minutos pode-se verificar a presença de ligantes para receptores de PMN nessa superfície (P-selectina-CD-62P)

(ERIKSSON, C. et al., 2001; NYGREN et al., 1997). A superfície do titânio pode induzir a produção de fatores que são quimiotáticos aos PMNs via ativação de complemento e plaquetas. Enquanto os receptores de plaquetas têm como ligantes IgG e fibrinogênio, os receptores de granulócitos podem aderir a fibrinogênio, IgG, complemento e a plaquetas quando presentes na superfície do metal (HAIMOVICH et al., 1993). Eriksson et al. 2001, utilizando sangue total, encontraram na superfície de TiO_2 a presença de eritrócitos (9% to 10%), granulócitos (9% to 14%), e plaquetas (1% to 4%,) nas primeiras duas horas de contato. A adesão de PMNs ao titânio foi associada a um rápido decréscimo na expressão de L-selectina em 16 minutos. Inicialmente houve um predomínio da expressão de receptores FcγRIII (CD-16), sendo que após 30 minutos ocorreu uma mudança desse quadro com maior expressão de integrinas CD-11b, CD-18. Após uma hora de contato do sangue total à superfície do titânio houve decréscimo de todos os receptores expressos (ERIKSSON; NYGREN, 2001a) (TANG et al., 1997), o que pode estar associado à apoptose (WHYTE et al., 1993). Nesse mesmo estudo, os neutrófilos não foram ativados pelo contato com placas de óxido de titânio, e não houve explosão respiratória. Posteriormente, frente a outro estímulo como o Zymosan opsonizado, os PMNs mantiveram sua capacidade de ativação em resposta a patógenos (ERIKSSON; NYGREN, 2001a). A ausência de explosão respiratória na superfície de TiO_2 tem sido explicada pelo fato de FcγRIII (CD16) poder atuar como um receptor de adesão sem ativar essa via (ERIKSSON; NYGREN, 2001b), interagindo com integrinas (CD11b), (ZHOU; BROWN, 1994). Por outro lado as respostas dos neutrófilos a superfícies lisas ou rugosas demonstra que a diferença entre a expressão de L-selectina e CD-11b é influenciada pela interação dos neutrófilos com o TiO_2 , mas não pela diferença entre a textura das superfícies. Esse processo de adesão independe da presença de outras células ou mediadores plasmáticos (SILVA, 2011). Ericksson e Nygren, 2001 observaram em relação a

interação de neutrófilos com superfícies hidrofóbicas que o aumento da expressão de CD-11b foi tempo-dependente. Nas superfícies hidrofílicas a expressão de CD-11b ocorreu após 32 minutos em sangue total e a expressão de CD-11b e CD-16 foi dependente de trombina (ERIKSSON; NYGREN, 2001b).

1.7.2 Micropartículas

Estudos *in vivo* e *in vitro* demonstram os efeitos da interação de partículas de TiO₂ com células e tecidos. O tamanho das partículas tem sido considerado um importante fator correlacionado a toxicidade no meio biológico. Quando partículas maiores (40-150 µm) são inseridas nos tecidos vivos ocorre uma reação inflamatória com envolvimento dessas por tecido fibroso e ausência de eventos celulares de fagocitose (KUMAZAWA et al., 2002). Entretanto, Tamura et al. 2002 demonstraram que partículas de TiO₂ com 2 µm foram fagocitadas por neutrófilos, com produção de ânion superóxido e TNF-α (TAMURA et al., 2002). O estudo de Kumazawa e colaboradores de 2002 foi um dos primeiros a mencionar que a citotoxicidade das partículas de titânio é tamanho-dependente e que os PMNs têm suas funções diferentemente moduladas pelo tamanho dessas partículas. Nesse estudo verificaram os efeitos sobre as funções dos neutrófilos humanos expostos a soluções e partículas de titânio (Ti), vanádio (V) e níquel (Ni) e avaliaram a citotoxicidade e biocompatibilidade *in vitro* e *in vivo*. Análises bioquímicas com lactato desidrogenase (LDH), ânion superóxido (O₂⁻) com ferrocitocromo c, TNF-α por ELISA e microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostraram que Ni em solução destrói a membrana celular de neutrófilos. De outra forma, Ti e V em solução estimularam neutrófilos e aumentaram a quantidade de ânion superóxido liberado. Ao utilizar partículas finas (1-3 µm) menores que os neutrófilos que têm diâmetro de 5-10 µm, tais partículas foram fagocitadas pelas células, com grande produção de ânion superóxido e expressão de TNF-α (KUMAZAWA et al., 2002). Tamura et al. 2004 observaram que a liberação de ânion superóxido e produção de citocinas inflamatórias ocorreu em partículas de 3 µm ou menores e pouca expressão foi verificada em partículas com 10 µm ou acima desse valor em eventos relacionados com fagocitose de neutrófilos (TAMURA et al., 2004).

1.7.3 Nanopartículas

Por muitos anos o TiO_2 foi considerado biologicamente inerte, independente da via de penetração no organismo (exposição ocupacional, meio ambiente ou materiais e drogas biomédicos) e com a característica de não promover dano ao meio biológico (HAMILTON et al., 2009) (ROSENBERG; GRÄTZ; HF, 1993). Entretanto as incertezas quanto aos efeitos biológicos do uso dos nanomateriais têm promovido a busca por respostas para essa interação com o organismo (HARAGUSHI, 2004; LARSEN, M. et al., 2006). O termo nanomateriais é utilizado para descrever materiais inorgânicos, uniformes com dimensão crítica abaixo de 100nm, especialmente projetados para aplicação comercial (COLVIN, 2003). De modo geral, partículas com tamanhos menores que 100 nm de diâmetro são referidas como ultrafinas pelos toxicologistas e são chamadas de nanopartículas pelos físicos (SINGH, 2005). Os nanomateriais, como o TiO_2 podem ser concebidos em diferentes formas e tamanhos, com respostas variadas (RODRIGUEZ et al., 1999) influenciadas pelas propriedades de superfície das NPs como tamanho, forma e a carga (PEREIRA, 2010; UNFRIED et al., 2007). As propriedades que distinguem as nanopartículas das macro e micropartículas tipicamente tornam-se ativas biologicamente abaixo de 100-200 nm (WATARI et al., 2009).

A literatura demonstra a interação de diferentes materiais nanoparticulados com células e tecidos in vivo e in vitro (BUSCH et al., 2011; GEISER et al., 2005 ; KASTENMAYER, 1994; KUMAR, 2010 ; PUJALTÉ et al., 2011; SCOWN, 2009). Entretanto, os relatos sobre a interação dos neutrófilos com nanopartículas de titânio não aparecem em grande número na literatura especializada. Estudo realizado com neutrófilos de peixes utilizou NPs de TiO_2 (< 100 nm) com 0,1–1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Os autores concluíram que houve aumento da explosão respiratória isoladamente ou em combinação com PMA e que NETs não foram liberadas com NPs de TiO_2 isoladamente mas somente quando em combinação com PMA. Em nenhuma condição houve desgranulação dos neutrófilos (JOVANOVIĆ et al., 2011).

Um dos primeiros relatos com neutrófilos humanos, foi o de Hedenborg em 1988, demonstrando que as nanopartículas TiO_2 (345-1000 nm) promoveram a

produção de ERO (Espécie Reativa de Oxigênio) e que o tamanho das partículas e a estrutura da superfície determinaram a intensidade da ativação dos PMNs humanos (HEDENBORG, 1988). Tamura et al 2004 relataram que a citotoxicidade das partículas em neutrófilos, era tamanho-dependente. Observaram que comparativamente com partículas de TiO_2 (2, 10, 45, 150 μm) as NPs de níquel (400nm) promoveram intenso processo inflamatório e necrose tecidual. Os neutrófilos tiveram sua morfologia alterada pelas NPs de níquel, com destruição da membrana celular. Houve ainda, em relação aos PMNs, diminuição da taxa de viabilidade celular, confirmando a citotoxicidade por dissolução iônica e pelo efeito do tamanho das NPs (TAMURA et al., 2004).

Dois trabalhos de Gonçalves et al. mostraram os efeitos da interação de neutrófilos humanos com NPs de TiO_2 . No primeiro relato a ativação dos neutrófilos estimulados com nanopartículas (1-10nm) e os efeitos *in vitro* foram evidenciados (GONÇALVES et al., 2010). Experimentos cinéticos em 24 horas, demonstraram ausência de necrose após tratamento dos PMNs com TiO_2 (0–100 $\mu\text{g/mL}$). As NPs induziram alterações da morfologia celular de forma concentração-dependente ao longo do tempo, indicando seu potencial de ativação sobre as células. A ativação foi demonstrada ainda pela intensa e rápida fosforilação das enzimas da família MAPK, p38 e Erk-1/2. Por outro lado a apoptose foi inibida em concentração de $\text{TiO}_2 \geq 20 \mu\text{g/mL}$. O sobrenadante dos neutrófilos incubados com TiO_2 foram colhidos e verificaram a expressão de 36 diferentes analitos, sendo GRO- α e IL-8 os de maior expressão (GONÇALVES et al., 2010, GONÇALVES; GIRARD, 2011).

No segundo estudo, Gonçalves et al. 2011 evidenciaram *in vivo* (subcutâneo de murinos) o fluxo de neutrófilos ao espaço subcutâneo no período de 3-9 horas, e a expressão de citocinas pró-inflamatórias após estímulo com NPs de TiO_2 (1-10nm), (100 $\mu\text{g/mL}$). Os neutrófilos teciduais representaram mais de 80% das células e o restante foram mononucleares. Com teste ELISA, o exsudato demonstrou aumento da produção de 40 analitos, com diversas quimiocinas. A expressão de MIP-1 estava significativamente aumentada em relação aos controles (GONÇALVES; GIRARD, 2011).

1.8 Morfologia dos neutrófilos em contato com NPs de TiO_2

Os neutrófilos podem ser classificados em 3 fenótipos diferentes: quiescente, estimulado e ativado. Esses fenótipos guardam estreita relação com a morfologia dessas células uma vez que para cada estímulo haverá uma resposta com alteração na fisiologia e na morfologia dos PMNs para permitir a migração e execução das suas funções. Dessa forma, as alterações bioquímicas durante as respostas celulares a estímulos envolvem mudanças subcelulares citoplasmáticas (grânulos, montagem parcial ou completa da NADPH) e na membrana celular.

A morfologia dos neutrófilos quiescentes exibe uma característica esférica e uma membrana com superfície irregular com várias microvilosidades (dobras ou projeções curtas), (HERANT; HEINRICH; DEMBO, 2005 ; ROBINSON, 1985), com comprimento médio de 300 nm (SHAO; TING-BEALL; HOCHMUTH, 1988). Internamente os PMNs, apresentam o núcleo multilobulado, possuem numerosos grânulos citoplasmáticos e poucas vesículas (LANNAN et al., 1992), além das organelas comuns às células eucarióticas.

Um grande número de fatores podem influenciar a capacidade de deformação dos PMNs. Citam-se a fluidez e tensão cortical da membrana celular (SIMON; SCHMID-SCHÖNBEIN, 1988), *turnover* do citoesqueleto, viscosidade do citoplasma, o tamanho do núcleo e sua área de superfície (relação do volume celular), (CHIEN et al., 1984). A área total da membrana celular contém 40 a 90% de excesso em relação à área necessária para conter o seu volume (BAGGE, 1976). Assim, durante a ativação dos neutrófilos, as dobras da superfície da membrana permitem a expansão e intensa mudança da morfologia dessas células (LANNAN et al., 1992).

Lannan e colaboradores 1992, realizaram estudos morfométricos e morfológicos em PMNs submetidos à exposição à fumaça de cigarros e seus compostos. Observaram que o diâmetro máximo e a circunferência celular aumentaram após 4 minutos de exposição em comparação com os controles. Por outro lado, a morfologia celular demonstrou a formação de vesículas na superfície da membrana (LANNAN et al., 1992). Assim como a exposição à fumaça de cigarros promove alterações morfológicas nos PMNs, outros agentes podem estar envolvidos, como: PMA, fMLP, citocinas, complemento, PAF, LTB₄, LPS, entre outros.

Em relação a captação de NPs de TiO₂, a literatura demonstra que células fagocíticas e não fagocíticas internalizam o metal, seja passivamente ou por

fagocitose com alteração da morfologia: Queratinócitos humanos— HaCaT, células epiteliais de pulmão— A549, linhagem celular de monócitos (primários- peripheral blood mononuclear cells)— PBMC, linhagem celular oligodendroglial de ratos — OLN93, linfócitos e monócitos permanentes-THP1 (BUSCH et al., 2011); fibroblastos da derme (PAN et al., 2009), macrófagos murinos (SCHERBART et al., 2011b), macrófagos pulmonares de suínos e eritrócitos humanos (GEISER et al., 2005).

Neutrófilos em contato com partículas e nanopartículas de TiO_2 são estimulados e podem ser observadas alterações na morfologia celular relacionadas à membrana e alterações do citoesqueleto com modificação das fibras de actina (TAMURA et al., 2004). A interação das células com metais pode, por vezes, levar à formação de vesículas ou zeiose na superfície da membrana, aspecto sugestivo de injúria oxidativa levando à contração celular que é uma característica da apoptose (RANA, 2008). Kumazawa et al. 2002 demonstraram que a membrana celular de neutrófilos sofreu expansão em solução com 10 ppm de TiO_2 e a morfologia da membrana tornou-se mais complexa do que os controles celulares (KUMAZAWA et al., 2002). Tamura et al. 2002, mostraram que partículas de titânio com 2 μm tornaram a membrana celular de rugosa para lisa enquanto partículas de 10 a 45 μm ou maiores induziram pouca alteração na morfologia celular (TAMURA et al., 2002). Entretanto, poucas evidências científicas demonstram as alterações morfológicas dos neutrófilos expostos a NPs de TiO_2 (GONÇALVES et al., 2010; GONÇALVES; GIRARD, 2011; HEDENBORG, 1988; WATARI et al., 2007; WATARI et al., 2009)

A alteração da morfologia celular é influenciada pelas propriedades físico-químicas, concentração e tamanho das partículas. Hedenborg, 1988 afirmou que o tamanho da partícula e a estrutura da superfície de TiO_2 determinaram o modo e a intensidade da ativação dos PMNs e a consequente alteração na morfologia (HEDENBORG, 1988). Gonçalves e colaboradores, 2010 mostraram que concentrações de 100 $\mu\text{g/mL}$ promoveram intensas alterações na morfologia dos neutrófilos (GONÇALVES et al., 2010). Watari et al., 2009 observaram deformação celular e fagocitose das NPs de TiO_2 (500 nm) enquanto em partículas maiores que 10 μm não foi observada fagocitose (WATARI et al., 2009).

As alterações da morfologia dos neutrófilos podem ainda ser representadas por citonemas, poros e NETs.

1.8.1 Formação de extensões tubulovesiculares ou citonemas

O processo de ativação leva os neutrófilos inicialmente a uma deformação de sua morfologia e finalmente à migração. Antes da migração as células se polarizam e desenvolvem uma borda anterior ou lamelipódia (*front or leading edge*) rica em filamentos de actina e uma borda posterior ou uropódia (*back or trailing edge*) rica em um complexo de actinmiosina (SENGUPTA et al., 2006). Sabe-se que a locomoção celular requer um mecanismo contínuo de adesão e liberação da célula do substrato (VEREYCKEN et al., 1995). Por sua vez, a regulação da morfologia celular está relacionada à adesão da lamelipódia e a liberação da parte posterior, a uropódia. As integrinas da parte aderente da célula conectam o citoesqueleto com a matriz extracelular ou substrato, produzindo as forças necessárias para a locomoção (ROCA-CUSACHS; ALMENDROS I; SUNYER R; et al., 2006). Além da locomoção os neutrófilos emitem e recebem moléculas de sinalização para comunicação com outras células a distância e por outro lado podem comunicar-se diretamente por citonemas (extensões tubulovesiculares, nanotubos) um tipo de filopódia especializada (BARTNECK, M. et al., 2010; GALKINA, S. et al., 2005). Quando a propagação ou migração dos neutrófilos foi impedida por diversos agentes (ex: 4-bromo- Fenacil-brometo, N-etilmaleimido, 7-cloro-4-nitrobenzeno-2-oxa-1,3-diazole e citocalasina D) ocorreu a formação de longas e finas extensões tubulovesiculares (citonemas) após adesão a um substrato com fibronectina (GALKINA; SUD'INA; ULLRICH, 2001). Dois tipos de extensões foram identificadas por microscopias (MEV e Contraste de Fase): (1) extensões tubulovesiculares altamente dinâmicas e flexíveis com as extremidades não aderidas ao substrato. Apresentam 160–240 nm em diâmetro e com comprimento que pode alcançar de 70 – 80 µm, por um período de estímulo de 20 min, (2) delgadas extensões retilíneas com extremidades planas ou achatadas formadas na presença de PMA, conectando as células ao substrato ou a células vizinhas a grandes distâncias. As extensões podem representar mecanismos utilizados pela célula para adesão, sensorial, transporte e comunicação, tornando-se mais abundantes em número e comprimento, de forma tempo- dependente (GALKINA et al., 2001). Outra função dos citonemas é de adesão e agregação a bactérias a distância, levando à fagocitose após estimulação

por óxido nítrico (GALKINA et al., 2009). Em um estudo envolvendo análise proteômica, Galkina et al., (2012) demonstraram que as extensões tubulovesiculares representam um meio de trânsito de proteínas bactericidas dos grânulos como, a) lactoferrina, lipocalina, mieloperoxidase, catepsina G e defensinas; (b) enzimas do metabolismo energético; (c) proteínas do citoesqueleto, actina; (d) proteínas S100; e) anexina. Afirmaram que os citonemas permitem que os neutrófilos liberem secreções bactericidas a longa distância sem diluição ou injúrias aos tecidos circundantes (GALKINA et al., 2012).

Outro aspecto morfológico que pode relacionar-se com citonemas é a formação de poros específicos na membrana citoplasmática em decorrência da degradação destas extensões (GALKINA, et al., 2005). Ainda não há evidências da formação de citonema após interação com NPs de TiO_2 (GONÇALVES et al., 2011), entretanto sabe-se que vesículas e poros podem formar-se na membrana plasmática pela interação com outras NPs (GUDURU, 2011).

1.8.2 Formação de poros e vesículas na membrana

Poros podem ser formados na membrana plasmática pela interação com NPs, já que é a primeira área de contato entre a célula e essas estruturas. A formação de poros em nanoescala na membrana foi proposta por Mecke et al. 2004, usando microscopia de força atômica (MECKE et al., 2004). As interações NPs-membrana são amplamente afetadas pelas propriedades de superfície das NPs tais como tamanho, forma e carga. Já foi demonstrada a ruptura da integridade da membrana plasmática quando tratadas com NPs contendo grupos carregados positivamente (tal como polímeros: polietilenamina e poliamidoamina) nas suas superfícies (HONG et al., 2004). A formação desses nanoporos aumenta a permeabilidade da membrana e pode ainda promover a captação das NPs por endocitose. A aglomeração (partículas encontram-se ligadas por forças fracas, por exemplo: forças de Van der Waals, capilaridade) e agregação (partículas unidas por ligações químicas- forças fortes) de NPs de TiO_2 são mecanismos conhecidos (PEREIRA, 2010) e podem ocorrer na superfície da membrana comprometendo a comunicação com o meio externo (KIRCHNER et al., 2005). Além disso sabe-se que o tamanho e a natureza química dos agregados de NPs de TiO_2 estão relacionados com a toxicidade (GRASSIAN et al., 2007).

As vesículas (protrusões do plasmalema) representam um aspecto característico de células lesadas. O rompimento da membrana pode ocorrer em condições de stress mecânico da célula, pela ação de toxinas formadoras de poros e fosfolipases e proteínas autoimunes formadoras de poros (perfurinas) para eliminação de patógenos (PARKER; FEIL, 2005). As células nucleadas corrigem a permeabilidade da membrana por um processo de re-selamento. Caso ocorra falha no selamento o conteúdo celular é perdido. Quando o influxo de Ca^{2+} extracelular não é restringido o dano pode ser irreversível. A elevação abrupta de Ca^{2+} intracelular ativa proteinases e fosfolipases causando dano generalizado à bicamada fosfolipídica e ao citoesqueleto. Nas células lesadas o influxo de Ca^{2+} extracelular desencadeia um processo de formação de vesículas na membrana plasmática que é muitas vezes considerado como um prenúncio de morte celular. As vesículas são produzidas em determinadas regiões da membrana plasmática por destacamento ou separação do córtex da actina (CHARRAS et al., 2008). O deslocamento e o aumento do citoplasma em direção à vesícula formada são conduzidas por uma contração da actinmiosina cortical, que gera uma pressão hidrostática gerando herniamento da membrana plasmática (TINEVEZ et al., 2009). A formação das vesículas pode ocorrer por mecanismos dependentes ou independentes de Ca^{2+} que ativam miosina ou induzem a reorganização do citoesqueleto e estruturas corticais (CHARRAS; PALUCH, 2008). As vesículas podem surgir em processos fisiológicos como: citocinese, locomoção (KELLER; EGGLI, 1998), injúria e apoptose (CHARRAS, 2008).

Babiychuk et al. (2011) propuseram um mecanismo pelo qual as vesículas da superfície da membrana desempenhariam um papel de proteção ao plasmalema e não apenas o antigo conceito de morte celular iminente. Nesse estudo foram analisadas diversas células, dentre elas, linfócitos T Jurkat. O mecanismo de proteção à membrana pôde ser resumido da seguinte forma (1) Uma lesão da membrana plasmática (por ruptura mecânica, proteínas citotóxicas, lise da bicamada lipídica, NPs) promove a formação de poros, alterando a barreira de permeabilidade, permitindo assim que ocorra um influxo de Ca^{2+} e um efluxo dos componentes intracelulares, (2) A injúria promovida pelo influxo de Ca^{2+} desencadeia a fosforilação de miosina II via miosina cinase de cadeia leve dependente de Ca^{2+} /calmodulina. A miosina provavelmente induz a contração do citoesqueleto cortical promovendo o

aumento localizado da pressão hidrostática no interior do citoplasma subjacente. A membrana plasmática ao redor da lesão hernia para formar uma vesícula contendo o remanescente com injúria. Caso a célula seja capaz de reparar o dano sofrido localmente pela membrana, a elevada concentração de Ca^{2+} é bombeada para fora e pode ocorrer a contração da vesícula. No entanto, se o reselamento falha, a concentração de Ca^{2+} no interior da vesícula aumenta, (3) caso a concentração de Ca^{2+} no interior da vesícula atinja 10 mM, a anexina A1 liga-se à membrana plasmática criando um vácuo internamente. A anexina A1 citosólica segue para o maior gradiente de concentração sendo levada para o interior da vesícula. No lado citoplasmático da vesícula uma pequena abertura é formada para o influxo de Ca^{2+} ocorrendo uma redução rápida nessa concentração devido a difusão para o citoplasma onde é sequestrado pelo retículo endoplasmático e mitocôndria. A elevada concentração local de Ca^{2+} leva a anexina A1 a ligar-se à membrana plasmática nas proximidades ou no interior da abertura da vesícula. A formação de ceramidas(esfingolipídios) no plasmalema induzida por Ca^{2+} pode aumentar ainda mais a selectividade de ligação da anexina A1. O aumento de Anexina A1 forma um tampão impedindo o efluxo do citosol e ao mesmo tempo os agentes de injúria extracelulares permanecem aprisionados no interior da vesícula (BABYCHUK et al., 2011 ; BABYCHUK, E. et al., 2009).

1.8.3 Formação de NETs

As NETs (*neutrophil extracellular traps*) têm aproximadamente 15 nm em diâmetro são formadas como resultado da morte celular (NETose) após ativação prolongada (3 h) por exemplo por PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate) e são capazes de eliminar bactérias. São constituídas de proteínas dos grânulos e de cromatina, que formam uma extensa rede (BRINKMANN et al., 2004). A NETose difere da apoptose e da necrose pela liberação ativa de cromatina nuclear. Esse mecanismo é desencadeado por uma variedade de estímulos incluindo microorganismos, citocinas proinflamatórias, plaquetas ativadas, células endoteliais (NEELI; RADIC, 2012; URBAN, REICHARD, BRINKMANN, ZYCHLINSKY, 2006).

Uma variedade de auto-antígenos estão presentes ligados a fibras de cromatina

das NETs, incluindo histonas citrulinadas e várias enzimas e proteínas bactericidas como catelicidina LL-37, elastase e mieloperoxidase (MPO). Durante a ativação dos neutrófilos a elastase migra dos grânulos azurofílicos para o núcleo, onde degrada parcialmente histonas específicas e promove a descondensação da cromatina auxiliada pela MPO, fenômeno considerado fundamental para formação das NETs (VILLANUEVA et al., 2011).

Recentemente, a formação de NETs (15 minutos), composta por ADN e proteínas foi relacionada com NPs de ouro (15 e 50 nm). As NETs representaram uma barreira física que envolveu as NPs e a carga positiva aumentou significativamente a formação da rede (BARTNECK et al., 2010). Por sua vez a incubação, *in vitro*, de 0,1 µg/mL de nanopartículas de TiO₂ em neutrófilos de peixes (*fathead minnow*) demonstrou explosão respiratória mas ausência de NETs. Entretanto quando as NPs de TiO₂ foram incubadas em conjunto com PMA houve rápida e intensa formação de NETs e explosão respiratória (JOVANOVIĆ et al., 2011).

1.9 Mecanismos de Captação de Nanopartículas de TiO₂

Ainda hoje os mecanismos pelos quais as nanopartículas penetram as membranas celulares e a sua distribuição para órgãos-alvo tem sido motivo de intensas pesquisas (GEISER et al., 2005 ; GRATTON, 2008 ; OOSTHUIZENA et al., 2012). As nanopartículas podem penetrar as células fagocíticas e as não fagocíticas (BUSCH et al., 2011; TAMURA et al., 2004; VAMANU; CIMPAN; et al., 2008) potencializando o risco à toxicidade pelo acesso direto às proteínas intracelulares , organelas e ADN (LI et al., 2003).

A captação das partículas de TiO₂ é influenciada por um grande número de fatores, como as dimensões e forma das NPs, a sua área superficial específica, a concentração, a polidispersibilidade e diversos parâmetros do meio (pH, concentração iônica, composição, etc.), (JIANG et al., 2008; PEREIRA, 2010). Deve-se considerar, ainda, que esses fatores interferem na habilidade do TiO₂ em penetrar nas células (KARLSSON et al., 2009). Assim, visando analisar os efeitos dos agregados de nanopartículas de TiO₂ em células, Okuda-Shimazaki e cols. (2010),

verificaram que os agregados maiores (596 nm) promoveram maior alteração na viabilidade celular, inflamação e expressão gênica, que os agregados menores (166 nm), (OKUDA-SHIMAZAKI et al., 2010).

Dessa forma, ganham importância as vias de transporte na captação de partículas e nanopartículas pela membrana celular. Em geral, partículas maiores micrométricas são incorporadas por fagocitose em células especializadas como monócitos, macrófagos e neutrófilos (BUSCH et al., 2011) e as NPs (0-100 nm) parecem utilizar outras vias. Portanto, além da fagocitose as vias que podem estar envolvidas no processo de internalização de nanopartículas incluem: a) endocitose mediada por Clatrina, b) endocitose mediada por caveolina, c) macropinocitose, d) via independente de clatrina/caveolina. A principal via de captação é pela clatrina que além de ajudar na biogênese de vesículas, parece estar envolvida também na proteção e no processo de endereçamento de proteínas por meio dessas vesículas para o citosol (YBE et al., 1999). A via dependente de caveolina e da macropinocitose apresentam uma cinética menor do que a via mediada pela clatrina e os endossomas formados por aquelas vias não são direcionados para lisossomas. A captação passiva, também deve ser considerada para penetração de NPs (ARORA et al., 2010; GEISER et al., 2005). A endocitose mediada por clatrina é o mecanismo mais estudado e acreditou-se ser o único mecanismo de endocitose em adição à fagocitose e à macropinocitose. No entanto, durante os últimos 20 anos, vários mecanismos independentes de Clatrina foram descritos. Estes incluem mecanismos dependentes de dinamina (dependentes de RhoA e *caveolin-caveolae/lipid rafts*) e os mecanismos independentes de dinamina (Cdc42 dependente e ARF6 dependentes). A captação dependente de Cdc42/Arf1 tem sido chamada de via CLIC / GEEC (CLIC- carreador independente de clatrina; GEEC, GPI-AP- proteínas ancoradas glicosil-fosfatidilinositol) um compartimento endossomal primário enriquecido (IVERSEN et al., 2011), (Figura 2).

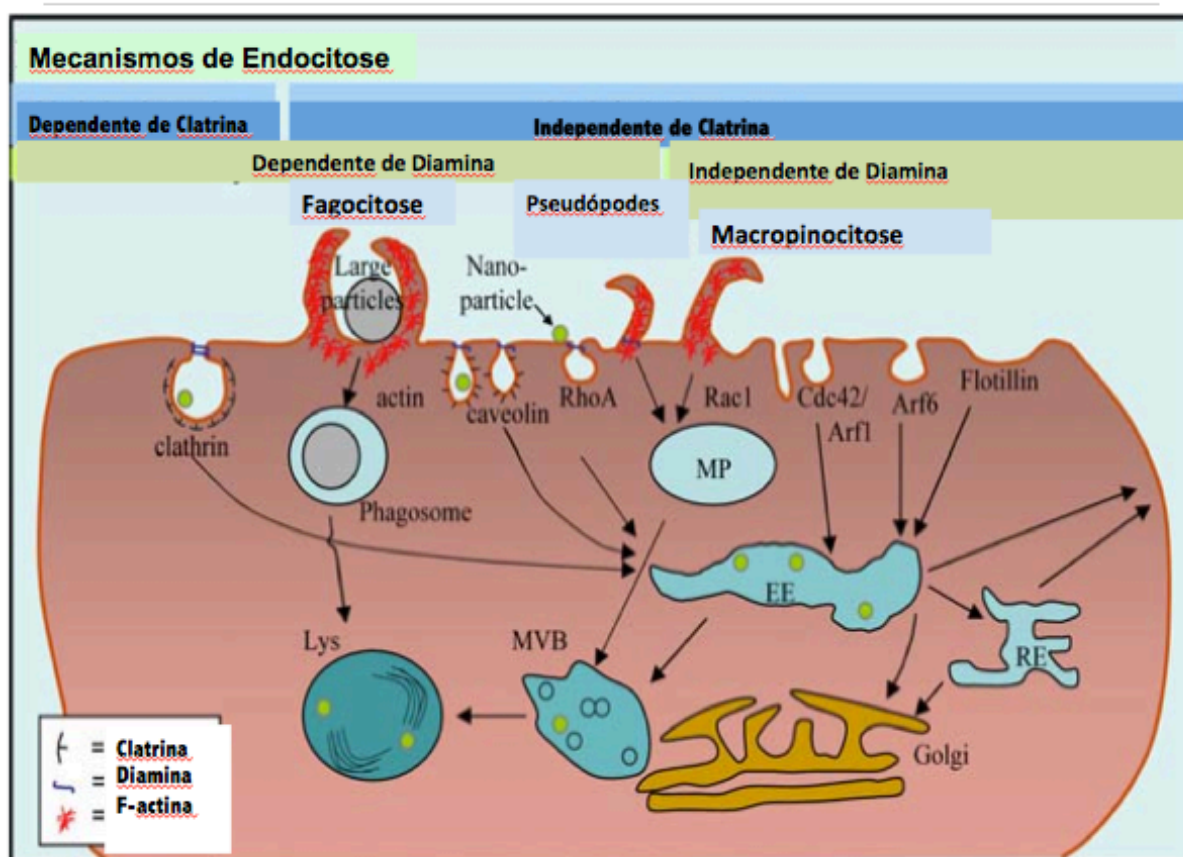


Figura 2- Mecanismos de endocitose de nanopartículas evidenciado por IVERSEN et al., 2011.

Outra via que tem recebido destaque nos últimos anos é a dos inflamosomos quando as NP passam a membrana passivamente e ligam-se a um complexo protéico. Esse complexo citoplasmático multiprotéico encontrado em macrófagos e neutrófilos, tem como função mediar a ativação de caspases e, finalmente, estimular a produção de IL-1 α . É constituído essencialmente por NALP, um receptor intracelular, sendo o inflamosomo NALP3 (também chamada criopirina) o mais conhecido. NALP 3 interage com a proteína ASC (*apoptosis-associated speck-like protein*) e CARD (domínio de recrutamento de caspases) permitindo o recrutamento de caspase-1. A proteína ASC consiste de um domínio pirina (PYD) e um domínio CARD que interage com pró-caspase 1, liberando sua forma ativa (caspase-1), (PETRILLI; MARTINON, 2007). CARD é formado por um domínio FIIND e outro domínio que interage com uma segunda molécula de pró-caspase 1. Por sua vez, NALP3 tem um C-terminal de repetições ricas em leucina (LRR) capaz de detectar sinais, e um domínio pirina (PYD), que é essencial nessa cadeia, já que interage

com o domínio PYD da proteína ASC. Assim, NALP3 é estimulada a reconhecer por meio das suas LRR compostos diferentes como RNA bacteriano, ATP, cristais de ácido úrico, imiquimod, baixas concentrações de K e a radiação UVB, libertando as formas ativas de caspase-1 através dessas proteínas adaptadores clivando unidades de pro IL-1 β e ativando a seguir IL-1 β potente estimulador de inflamação. Além disso, estimularia a liberação de IL-18 e o Fator Nuclear Kappa B (NF- κ B). Por outro lado, o inflamossomo NALP3 seria regulado pela inibição de ASC por uma proteína pirina intracelular podendo ainda estimular a liberação de IL-18 e fator nuclear kappa B (NF- κ B). (CHURCH; COOK; PRIMER, 2008). Yazdi et al., (2010) demonstrou que NPs de TiO₂ e NPs de SiO₂ ativaram o inflamossomo NLRP3 levando a liberação de IL-1 β e IL-1 α em queratinócitos e macrófagos. A atividade do inflamossomo ativado pelas NPs de TiO₂, não requer a participação da fagocitose mediada pelo citoesqueleto (YAZDIA et al., 2010).

A par dos mecanismos de incorporação de partículas pelas células, estudos demonstram a interação do TiO₂ com estruturas subcelulares e os possíveis mecanismos envolvidos nessa relação (BERMUDEZ et al., 2004 ; SINGH et al., 2007).

Amostras de TiO₂ finas (40–300 nm) e ultrafinas (20–80 nm) foram fagocitadas rapidamente por células epiteliais de pulmão A549, geralmente na forma de agregados junto à membrana e no citoplasma na forma de vesículas, vacúolos e corpos lamelares. Nenhuma partícula foi observada no interior do núcleo ou em outra organela. Houve forte geração de ROS e liberação de IL-8 (SINGH et al., 2007). Gheshlaghi et al., (2008) demonstraram que NPs de TiO₂ (20nm) interagiram com tubulina e microtubulina e tiveram efeito inibitório na polimerização da tubulina, alterando suas funções, como neurotransmissores em células do sistema nervoso, divisão celular e manutenção da morfologia (GHESHLAGHI et al., 2008).

1.10 Nanopartículas de TiO₂ e Citotoxicidade

1.10.1 Homeostase Intracelular

Com o uso crescente de NPs de TiO₂ em várias áreas e aplicações, atualmente há um consenso que as pesquisas devem analisar o risco de toxicidade pela interação desse metal no interior de sistemas biológicos (IAVICOLI; VERUSCKA; BERGAMASCHI, 2012). O perfil toxicológico das NPs TiO₂ ainda não foi completamente elucidado e ganha destaque em razão do seu potencial de citotoxicidade, estresse oxidativo e efeitos carcinogênicos (IARC, 2006;2010; SINGH, 2005). As nanopartículas podem gerar a formação de Espécies Reativas de Oxigênio/Nitrogênio (ERO/ERN) em meio biológico. ERO/ERN em células expostas a NPs podem ser consideradas como o principal fator relacionado à toxicidade levando à diminuição ou ablação das funções celulares por estresse oxidativo (BARILLET et al., 2010; PETERSEN; NELSON, 2010; PUJALTÉ et al., 2011). O estresse oxidativo desempenha importante papel na sinalização celular e nas respostas inflamatória, genotóxica e proliferativa. Três níveis de resposta celular ao modelo de estresse oxidativo podem ser delineados: nível 1-produção de enzimas antioxidantes (HO-1, NQO1, superóxido dismutase, catalases e glutathiona peroxidases). Caso ocorra falha da proteção no nível 1 para restaurar o equilíbrio redox celular, o nível 2 será desencadeado com a ativação de vias de sinalização pró-inflamatórias como as JNK e NF-κβ (NEL et al., 2006). Em níveis de estresse oxidativo mais elevados e prolongados (nível 3) o desarranjo celular levará a uma diminuição do potencial de membrana mitocondrial desencadeando a morte celular (HUANG; WU; RS, 2010). As ERO incluem superóxido (O₂⁻), radical hidroxila (HO[•]) e espécies não-radicalares como peróxido de hidrogênio (H₂O₂) enquanto ERN incluem óxido nítrico ON[•] e peróxinitrito (ONOO⁻). Para eliminar ERO/ERN as células utilizam um sistema antioxidante enzimático (SOD, catalase, glutathiona-GSH) e não enzimático (Tioredoxina-Trx), (TRACHOOTHAM et al., 2008). Sob estresse oxidativo ERO/ERN podem desestabilizar proteínas, lipídios e ADN (PUJALTÉ et al., 2011; TRACHOOTHAM et al., 2008). ERO e Ca²⁺ desempenham importante papel na ativação de várias vias como as MAP cinases e fatores de transcrição redox incluindo NF-κB, que pode levar à produção de moléculas pró-inflamatórias e mediadores (SCHERBART et al., 2011a). A concentração intracelular de Ca²⁺ desempenha um papel fundamental na regulação no metabolismo celular, tradução

de sinais e expressão gênica. Pode influenciar o ciclo celular pela ativação da Proteína C Cinase (PKC), Ca^{2+} /Calmodulina Proteína Cinase dependente (CaMK) e Proteína Cinase Mitogênica Ativada (MAPK). Alterações da concentração de Ca^{2+} estão associadas com disfunção celular, desequilíbrio metabólico e energético, doenças e morte celular (STONE et al., 2000). Portanto, o sistema redox é essencial na manutenção da homeostase celular (equilíbrio redox) através da geração e eliminação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. A homeostase redox celular regula a abundância de múltiplas proteínas codificadas de genes atuando na morte ou sobrevivência das células. Em resposta as alterações do estado oxidativo, a transcrição daqueles genes pode ser modulada em parte pelo controle do sistema redox sobre os fatores de transcrição.

O Fator Nuclear kappa B (NF- κ B) é um fator de transcrição redox-sensitivo que coordena reguladores de imunidade, inflamação, proliferação celular e sobrevivência (HAYDEN; GHOSH, 2004). Normalmente, os componentes de NF- κ B são sequestrados e inativados por um inibidor (I κ Bs) no citosol. Um grande número de estímulos incluindo citocinas e ERO são capazes de ativar NF- κ B via ativação de I κ B cinase (IKK). IKK ativada fosforila I κ B, levando à dissociação de NF- κ B do inibidor e à atração de I κ B para degradação pelo sistema ubiquitina/proteassoma (GILMORE, 2006). NF- κ B transloca-se para o núcleo liga-se ao ADN na região promotora e ativa a transcrição dos genes-alvo (COOKE, 2003).

1.10.2. Citotoxicidade

O TiO_2 é frequentemente utilizado diretamente no corpo humano para propósitos como diagnóstico, tratamento e prognóstico. O uso de NPs para testar a toxicidade é essencial para compreender os riscos à saúde humana. Conforme já citado, a literatura demonstra que a toxicidade das NPs de TiO_2 é influenciada por um grande número de fatores como as dimensões e forma das partículas, sua área específica, concentração, polidispersibilidade e diversos parâmetros do meio (pH/iônico: concentração e composição)(JIANG et al., 2008; PEREIRA, 2010). Esses fatores sozinhos ou conjugados estão correlacionados com a biocompatibilidade (PUJALTÉ et al., 2011; SCHRAND et al., 2010; WATARI et al., 2009).

As características mais usualmente medidas antes do início do estudo toxicológico para o TiO_2 são a medição do tamanho primário da partícula, área de superfície específica, cristalinidade, morfologia e potencial zeta. O seu efeito nos organismos é normalmente estudado através de técnicas de imagem para a identificação das nanopartículas nos organismos. O potencial zeta consiste numa diferença de potencial entre o plano de cisão da camada interior e exterior da camada elétrica dupla que envolve a partícula e a concentração de um ponto central (PEREIRA, 2010).

1.10.3 Propriedades físico-químicas das NPs e citotoxicidade

As dimensões das partículas de TiO_2 são fundamentais em relação a toxicidade. Tem sido demonstrado que nanopartículas são capazes de promover toxicidade mais pronunciada que micropartículas (WANG, J. et al., 2007). Deve ser considerado que as nanopartículas apresentam grande potencial de aglomeração e agregação e portanto é improvável que ocorra a exposição celular a forma isolada das NPs (JOHNSTON et al., 2009). Alterações do meio como pH e forças iônicas podem promover aglomeração ou agregação com efeitos biológicos diversos. Grassian et al 2007 demonstraram que o tamanho e a natureza dos agregados das NPs são fatores fundamentais na avaliação da toxicidade (GRASSIAN et al., 2007). Jiang et al. (2008) concluíram que com adições de sal superiores a 0,01M a concentração de íons do meio mostrou-se elevada o suficiente para diminuir significativamente a diferença de potencial Zeta, o que levou à compressão da camada e conseqüente aglomeração (aumento do diâmetro hidrodinâmico), gerando forças eletrostáticas repulsivas superiores às atrativas, inibindo a aglomeração. Por outro lado, uma maior concentração (0,1M) leva a forças atrativas maiores que as repulsivas produzindo aglomeração, além do aumento do diâmetro das partículas. O tempo necessário para obtenção da dispersão das partículas, por sonicação, foi de cerca de 120 segundos (por sonda com potência 750W (20kHz), (JIANG et al., 2008).

Em relação à morte celular, Hussain et al., (2010) verificaram aumento da apoptose de células epiteliais de brônquios (16HBE14o e células primárias) quando em contato com NPs de carbono black (13 nm) e TiO_2 (15 nm) durante 72 horas, observando que em meio fisiológico o diâmetro hidrodinâmico das partículas foi

maior do que na água como resultado da agregação das NPs. Os agregados das NPs de TiO_2 promoveram desestabilização dos lisossomos por peroxidação, assim como nos lipídios durante o processo de captação (HUSSAIN et al., 2010). Em outro estudo as NPs de TiO_2 não promoveram desestabilização do potencial de membrana mitocondrial o que ocorreu em 30 minutos com as NPs de Carbono Black. Estímulos como ERO, $\text{TNF-}\alpha$ promovem a desestabilização dos lisossomos levando à liberação de proteases principalmente Catepsina B que atua na clivagem de Pró-Caspase 8, desencadeando apoptose pelos executores Caspase 3 e 7, (LEIST; JAATTELA, 2001). As Caspases são sensíveis ao estado redox das células e em ambas NPs (carbono black e TiO_2) o estresse oxidativo foi tempo dependente ocorrendo proteólise e fragmentação do DNA. Em um outro estudo de Hussain et al. 2009, foi demonstrado que mesmo na forma de agregados os efeitos citotóxicos, pró-inflamatórios e oxidativos das NPs dependem do tamanho e da área de superfície das partículas primárias (HUSSAIN et al., 2009). Contudo em um estudo de Dick et al., (2003), as NPs de TiO_2 foram menos potentes na indução da resposta inflamatória em células pulmonares em comparação com níquel, cobalto ou carbono black, apesar da similaridade da área de superfície. Esse baixo potencial foi relacionado à sua baixa capacidade de gerar radicais livres o que aponta para uma contribuição do tipo de partícula e seus componentes químicos de superfície nos efeitos citotóxicos observados (DICK et al., 2003).

Bermudez et al., (2004) expuseram ratos à inalação de NPs de TiO_2 (21 nm) para avaliação da toxicidade pulmonar. Mesmo com os aerossóis formados foi possível detectar a presença de agregados de partículas com $1,37 \mu\text{m}$ os quais foram capazes de promover citotoxicidade (BERMUDEZ et al., 2004). Contudo Grassian et al. 2007 demonstraram que em ratos NPs de TiO_2 com 21 nm em aglomerados foram menos densas que as NPs com 5 nm cujos aglomerados estavam mais compactados. Verificaram que NPs com 21 nm foram mais tóxicas do que NPs com 5 nm, após exposição por inalação e instilação intratraqueal. O estado de aglomeração das partículas determinou o potencial tóxico das NPs.

A maior toxicidade das NPs em relação às partículas deve-se a uma maior área de superfície das NPs quando administradas em dose/massa equivalente. Sager et al., (2008) administrou NPs de TiO_2 por via intratraqueal em ratos e observou que uma massa maior de micropartículas foi necessária para promover a mesma

resposta inflamatória que as NPs. Contudo quando a dose de partículas administrada foi equivalente em termos de área de superfície liberada; ambas partículas tiveram o mesmo comportamento, o que sugere que o tamanho e área de superfície são essenciais para promover toxicidade (SAGER; KOMMINENI; CASTRANOVA, 2008).

Portanto o tamanho, área de superfície bem como aglomeração/agregação das NPs de TiO_2 são fundamentais para sua toxicidade. A agregação/aglomeração pode ser limitada pelo uso de sonicação e detergentes.

1.10.4 Influência da superfície química das NPs de TiO_2 e citotoxicidade

As propriedades da superfície das NPs de TiO_2 influenciam sua toxicidade. A superfície das NPs de TiO_2 podem ser alteradas pela adesão/adsorção de moléculas do meio, o que é conhecido como funcionalização de partículas. A superfície das NPs podem ainda ser revestidas com óxido de alumínio, sílica ou aumento da camada de óxido. Oberdörster, (2001) demonstrou que a exposição pulmonar de ratos, via intratraqueal (500 μg /animal, 24 horas) com TiO_2 (20 nm) sem revestimento (hidrofílica) induziram menor resposta inflamatória do que as receberam uma cobertura de silano (hidrofóbica), (OBERDÖRSTER, 2001). Hohr et al., (2002) investigaram o impacto das propriedades de superfície na toxicidade. Micropartículas (180 nm de diâmetro) e NPs de TiO_2 (20-30 nm de diâmetro) revestidas e não revestidas por metilação foram expostas a ratos via instilação intratraqueal (1 ou 6 mg/rato) durante 16 horas. A administração de todas as partículas estimulou a infiltração de neutrófilos com efeito mais pronunciado nos grupos com NPs. As NPs revestidas (hidrofóbicas) demonstraram um menor recrutamento de neutrófilos quando comparadas com as NPs não revestidas (hidrofílicas). Proteínas, LDH, TNF- α e MIP-2 presentes no lavado bronco-alveolar (BAL) exibiram o mesmo padrão, mas no geral o impacto da metilação na superfície de TiO_2 na toxicidade foi mínimo. Concluíram que a toxicidade dependia da área de superfície das NPs e não do revestimento. A resposta inflamatória das NPs foi mais acentuada do que com micropartículas (HOHR et al., 2002)

Em outro estudo Singh et al., (2007) determinou o impacto de micropartículas

(40-300 nm) e NPs (20-80 nm) de TiO_2 com superfície apresentando metilação (hidrofóbica) e potencial de geração de radicais sobre células epiteliais de pulmão (A549). As partículas foram fagocitadas em agregados independente do tamanho ou metilação a captação das NPs ocorreu por endocitose mediada por clatrina apenas em clusters menores que 30 nm o que pode indicar que esse fenômeno é tamanho-dependente. A geração de ERO e IL-8 pelas células expostas a NPs foi maior do que as micropartículas e não foram afetadas pela metilação da superfície. Independente do tamanho as partículas e NPs apresentavam-se de forma agregada. As NPs foram mais tóxicas (< 500nm) do que as partículas (2000-5000nm) apesar de sua agregação, mas isto deve-se a área de superfície (SINGH et al., 2007). Rehn et al., (2003) analisaram ratos expostos a TiO_2 por instilação intratraqueal (acima de 1,2 mg/rato) para verificar-se os efeitos citotóxicos e genotóxicos nos pulmões em 3, 21 e 90 dias pós exposição. Observaram que superfícies de TiO_2 (20nm) não-modificadas e aquelas revestidas com silano produziram um discreto aumento de neutrófilos e macrófagos nos pulmões após 3 dias e não houve produção de $\text{TNF-}\alpha$. Não houve efeito genotóxico com TiO_2 , mas ao contrário o quartzo produziu resposta inflamatória progressiva com genotoxicidade associada (REHN et al., 2003). Deve-se considerar que a modificação da superfície das NPs é capaz de influenciar sua toxicidade. Entretanto é provável que isso ocorra pelas modificações e pelo tipo celular empregado (JOHNSTON et al., 2009)

1.10.5 Influência da forma cristalina e toxicidade das NPs de TiO_2

O TiO_2 existe em três fases cristalinas, rutilo, anatase e brookita (HASEGAWA et al., 2001). As duas formas mais utilizadas são anatase e rutilo, as quais variam conforme sua estrutura cristalina e propriedades de superfície, responsáveis pela diferença de citotoxicidade. A forma anatase tem se mostrado mais tóxica (WANG et al., 2008). A fotoatividade do TiO_2 também depende da fase do cristal, bem como as características das partículas. Anatase tem a capacidade de gerar ERO pela exposição à luz (propriedades fotocatalíticas). Independente da escala TiO_2 mantém suas habilidades fotocatalíticas e em adição, a reatividade da superfície promove interações com moléculas biológicas como proteínas fosforiladas e peptídeos (LARSEN et al., 2006) bem como ADN (BROWN et al., 2008).

Sayes et al., (2006) avaliaram in vitro a toxicidade do TiO_2 anatase (10 nm),

rutilo (5 nm) ou anatase/rutilo (3 nm) em células epiteliais A549 e fibroblastos HDF, a uma concentração de 3 µg/ml a 30 mg/ml, 48 horas. As partículas anatase foram as mais tóxicas, enquanto rutilo foram as menos tóxicas. Paralelamente houve expressão de IL-8 nas células. As NPs de TiO₂ estimularam a geração de ERO e a fotoatividade foi maior nas partículas anatase. As propriedades químicas de superfície do rutilo foram menos reativas apesar de possuir área de superfície relativamente grande (112 m²/g), em relação a anatase que tinha área de superfície maior (153 m²/g). Os resultados demonstraram que a habilidade do TiO₂ de gerar ERO, regula seu potencial citotóxico e inflamatório em razão da sua estrutura cristalina e, portanto, a toxicidade não é determinada exclusivamente pela área de superfície. As NPs rutilo tiveram grande aglomeração e isto pode explicar também a baixa toxicidade. A conclusão é que as NPs anatase tiveram potencial tóxico maior que rutilo (SAYES et al., 2006). Entretanto, Pan et al., (2009) investigaram a toxicidade de NPs de TiO₂ em fibroblastos humanos. As NPs rutilo não revestidas (15 nm), polímero de rutilo TiO₂ ou anatase não revestidas (200 nm) foram expostas a células por até 11 dias, com concentração de 0.8 mg/mL. As NPs rutilo não revestidas promoveram alterações morfológicas celulares com alongamento e diminuição da área, e não aderiram na superfície de cultura. A forma anatase promoveu os maiores danos celulares com alterações morfológicas severas, ruptura dos filamentos de actina e da membrana celular. A forma rutilo não alterou a viabilidade celular, mas apresentou baixa taxa de proliferação. Essas partículas (rutilo) foram internalizadas no interior de vesículas no citoplasma. Por sua vez a forma anatase também foi internalizada pelas células e teve acesso ao núcleo. A produção de H₂O₂ e ERO pelas células foi maior com NPs anatase. Anatase promoveu maior dano celular que rutilo. As partículas revestidas não tornaram-se evidentes na superfície celular ou no interior das células. Assim, revestimento aboliu a toxicidade das partículas, impediu a internalização das mesmas, não ocorrendo alteração das funções celulares. Portanto, o revestimento das partículas foi capaz de modificar a toxicidade das mesmas (PAN et al., 2009).

1.10.6 Genotoxicidade

Os dados relativos aos efeitos genotóxicos das NPs de TiO₂ são conflitantes na literatura. Diferentes estudos relatam formação de micronúcleos (RAHMAN et al., 2002), presença de células multinucleadas (WANG; SANDERSON; WANG, 2007)

fragmentação inter-nucleosomal, fragmentação e dano ao ADN (KANG, S. et al., 2008a), aumento na frequência de cromosomos aberrantes (NAKAGAWA et al., 1997). Xu et al., (2009) demonstraram que NPs de TiO₂ e C₆₀ foram captados por fibroblastos primários de ratos e promoveram aumento na frequência de mutação por deleção de pares (XU et al., 2009). Entretanto, Bhattacharya et al., (2009) relataram aumento na formação de adutos mas ausência de dano ao ADN. Um aduto (do latim *adductus*, "atraído") é o produto da adição direta de duas ou mais moléculas diferentes, resultando em um único produto de reação contendo todos os átomos de todos os componentes iniciais. A presença de adutos pode induzir a erros de replicação do DNA e subsequente mutação genética e/ou formação de um tumor carcinogênico (BHATTACHARYA et al., 2009). As bases de ADN apresentam alta densidade eletrônica, atraindo as moléculas eletrofílicas carcinogênicas (provenientes do ar, alimentos, metais), às quais acabam se ligando geralmente a guanina ou outras bases levando à formação de adutos. Sendo formados no ADN através de mecanismos químicos específicos, tais adutos podem levar a mutações em proto-oncogenes ou em genes supressores de tumor e iniciar o processo de carcinogênese (COOKE, 2003). Da mesma forma outros estudos não correlacionam efeitos genotóxicos (dano ao ADN) com as NPs de TiO₂ (HACKENBERG et al., 2010), aberrações cromossômicas (WARHEIT et al., 2007), e geração de micronúcleos com ou sem irradiação UV (LINNAINMAA; KIVIPENSAS; VAINIO, 1997).

Esses dados conflitantes não revelam uma clara correlação entre genotoxicidade e as características das NPs de TiO₂. Deve-se considerar por isso as diferentes linhagens celulares e NPs de TiO₂ utilizados nos estudos, bem como os objetivos estipulados e os ensaios realizados. Os dados da literatura sugerem que cuidados devem ser adotados ao considerar parâmetros como radiação UV e superfície química das NPs a qual tem efeitos sinérgicos na indução de alterações genotóxicas. Outrossim, outros estudos são necessários para elucidar o papel genotóxico das NPs de TiO₂ (IAVICOLI et al., 2012).

1.10.7 Citotoxicidade de partículas e NPs de TiO₂ em neutrófilos

Em geral, a toxicidade promovida por partículas e NPs de TiO₂ em neutrófilos é tamanho-dependente. Kumazawa et al., (2002) compararam a citotoxicidade de TiO₂, Vanádio e Níquel em solução de HBSS (2 e 10 ppm) e particulados (1, 3 e 10 µm) em neutrófilos humanos. As partículas de níquel tinham 200nm e as taxas de viabilidade celular foram similares entre Titânio, Vanádio ou controles em soluções com concentrações de 2 e 10 ppm enquanto no níquel os níveis de LDH(Lactato desidrogenase) aumentaram significativamente, demonstrando a elevada citotoxicidade com ruptura da membrana celular. Neste estudo as funções celulares foram medidas pela produção de ânion superóxido e TNF-α. A produção de ânion superóxido teve aumento significativo para TiO₂ e Vanádio em relação aos controles indicando estímulo a membrana celular, mas observaram que *in vivo* a contínua produção poderá desencadear dano a ADN. Especificamente em relação à citotoxicidade de TiO₂ a produção de TNF-α ocorreu nas partículas de 1 e 3 µm (TNF-α é produzida quando as partículas são internalizadas pelos PMNs), promovendo ativação dos neutrófilos. Os autores observam em seu estudo que o aumento em TNF-α não foi causado por íons de titânio mas principalmente por partículas maiores que 450 nm. Assim, a citotoxicidade das partículas foi tamanho dependente (KUMAZAWA et al., 2002).

Tamura et al., (2002) investigaram a toxicidade de partículas de TiO₂ (2, 10, 45, 150 µm) e Níquel (400 nm e 5 µm) em solução com concentração de 2000 µg/mL em neutrófilos humanos. Foi realizada análise funcional bioquímica e observações da morfologia celular com microscopia de varredura e estudo histológico em ratos. Todos os resultados de taxa de viabilidade celular, produção de LDH, superóxido e liberação de TNF-α, IL-1β demonstraram que a citotoxicidade foi tamanho-dependente. A liberação de TNF-α e IL-1β aumentou significativamente nas soluções com TiO₂ com 2 µm as quais foram fagocitadas pelos neutrófilos. As imagens de microscopia de varredura mostraram alteração da morfologia em neutrófilos em partículas de 2 µm e pouca alteração na partículas maiores (10, 45, 150 µm). TNF-α e IL-1β foram liberadas quanto as partículas foram internalizadas pelos neutrófilos, promovendo estimulação e desencadeando a cascata de

inflamação. A produção de ânion superóxido aumentou significativamente nas partículas com 2 μm aumentando a toxicidade e risco de dano ao ADN. Os neutrófilos fagocitaram somente partículas menores que as células (tamanho dos neutrófilos: 5-10 μm). As partículas maiores de TiO_2 tiveram comportamento de biocompatibilidade. Por outro lado as partículas de níquel produziram pequenas níveis de ânion superóxido, provavelmente pela baixa taxa de viabilidade celular em razão do rompimento da membrana celular sendo altamente citotóxicos por sua dissolução iônica e secundariamente pelo efeito das dimensões das partículas (TAMURA et al., 2002).

Da mesma forma, a avaliação da viabilidade celular por Tamura et al., (2004) evidenciaram decréscimo nas taxas quando diminuiu o tamanho das partículas (*efeito- tamanho de partículas*). Demonstraram que neutrófilos estimulados por partículas de 3 μm ou menores mostraram a maior produção de ânion superóxido com possibilidade de desencadear a cascata inflamatória e promover injúrias aos tecidos adjacentes. Quando essas células entram em contato com partículas de 3 μm ou menores demonstraram grande produção de ânion superóxido, assim como a expressão de TNF-alfa e IL-1beta. As imagens por microscopia eletrônica revelaram alterações degenerativas na morfologia dos neutrófilos com pseudópodes e nanopartículas de TiO_2 de 50 nm e nanotubos de carbono fagocitadas no citoplasma (TAMURA et al., 2004). Paralelamente, os materiais em nanoescala podem induzir reações não-específicas em células e tecidos produzindo o fenômeno da *conversão das funções*. Assim o tamanho das partículas torna-se biointerativo abaixo do tamanho das células, aproximadamente 10 μm ou menores e pode levar à conversão das funções nos processos biológicos (WATARI et al., 2007). Deve-se considerar que nanomateriais são classificados como aqueles com escala de 1-100 nm em pelo menos uma das dimensões (GRASSIAN et al., 2007; HAMILTON et al., 2009; HUANG et al., 2010). Entretanto Watari et al., (2009) demonstraram que os tamanhos críticos da biointeratividade dos nanomateriais inicia-se abaixo de 10 μm e que podem invadir as unidades do organismo abaixo de 200 nm (tipicamente abaixo de 50 nm) levando a falhas do sistema imunológico em reconhecer as NPs (WATARI et al., 2009).

Estudo *in vitro* de Gonçalves et al., (2010), com neutrófilos demonstrou que nanopartículas de óxido de Titânio em concentrações maiores ou iguais a 20 $\mu\text{g/mL}$

não promoveram necrose celular após 24 horas de incubação, mas induziram alterações morfológicas indicando ativação e expressão de fosforilação da tirosina nas enzimas p38 MAPK e Erk-1/2. Esse estudo observou grande expressão de citocinas como IL-8 de neutrófilos (GONÇALVES et al., 2010). Comparativamente Kang et al., (2008) relataram a geração de EROs com dano ao ADN em linfócitos tratados com NPs de TiO₂, induzindo ativação de p53. Essa proteína ativa outras proteínas ligadas ao reparo de ADN e quando não for possível o reparo, induz apoptose celular. A família de proteínas MAPK (JNK1-3, ERK1-2, p38 MAPK) envolvidas em estresse celular, dano a membrana, choque osmótico, heat shock e outro grupo de cinases (ATR, ATM, CHK1 and CHK2, DNA-PK, CAK, TP53RK) envolvidas na avaliação da integridade do genoma, direcionam o domínio de transcrição para p53 (KANG, S. et al., 2008b; SCOWN, 2009).

1.10.8 Citotoxicidade das NPs de TiO₂ e apoptose de neutrófilos

Os neutrófilos em situações normais morrem por apoptose, a morte celular programada (WALKER et al., 2005). A rápida remoção de neutrófilos que sofreram apoptose por macrófagos é crucial para a resolução dos processos inflamatórios, incluindo a ativação de diferentes mecanismos anti-inflamatórios que suspendem o recrutamento de novas células imunes, citocinas pró-inflamatórias e as vias antiapoptóticas promovendo o reparo tecidual (PICHERT et al., 2012). Deve ser considerado ainda, que a presença de fosfatidilserina na superfície das células apoptóticas desempenha um papel fundamental no seu reconhecimento pelos macrófagos (KOOPMAN et al., 1994). As características da apoptose incluem a manutenção da integridade da membrana, agregação e marginalização da cromatina, diminuição do volume citoplasmático, condensação celular e do núcleo, fragmentação da célula em corpos apoptóticos e aumento da permeabilidade mitocondrial (DARZYNKIEWICZ et al., 1997). Conforme exposto anteriormente, a apoptose é induzida pela liberação de constituintes mitocondriais ou por sinalização via receptores de morte. Caspases são ativadas e iniciam a degradação de moléculas do citoesqueleto, DNA e outras estruturas celulares. Como resultado temos numerosas vesículas apoptóticas sem a liberação dos constituintes internos.

A cascata de apoptose é controlada por fosfatidilinositol 3-cinase, pela proteína cinase B, Gene A1 e Mcl-1 que impedem a ativação da caspase (DZHAGALOV; JOHN; HE, 2007; SIMON, 2003). Por outro lado, nos neutrófilos a via antiapoptótica é ativada pela sinalização de microorganismos, GM-CSF ou corpos estranhos como o TiO_2 (GONÇALVES; LIZ; GIRARD, 2011, MOISAN; KOUASSI; GIRARD, 2003).

O TiO_2 é considerado não fibrogênico (formação de granulomas) sendo utilizado como controle negativo em estudos experimentais sobre toxicidade de partículas (WANG, et al., 2002b). Suas partículas em baixas doses, são insolúveis e podem persistir, por exemplo nos pulmões por um longo período com baixa toxicidade bem como nos tecidos não causando inflamação persistente (OBERDÖRSTER; COX; GELEIN, 1997). Nesses casos a resolução da inflamação tem sido relacionada à apoptose (COX, 1996). Entretanto, em condições normais os neutrófilos sofrem apoptose sem estimulação, mantendo seu número estável em indivíduos saudáveis. Foi demonstrado que o estímulo de nanopartículas de TiO_2 em concentração igual ou maior que 20 $\mu g/mL$ teve um efeito anti-apoptótico tempo-dependente sobre neutrófilos humanos *in vitro*, durante 24 horas (GONÇALVES et al., 2010). Da mesma forma quando utilizada uma concentração de 200 $\mu g/mL$ não foi observada apoptose (HEDENBORG, 1988). De outro modo, a instilação traqueal de pequenas doses de nanopartículas de TiO_2 (2,5 mg/0,5 mL) em ratos promoveu uma rápida indução da apoptose em neutrófilos de alvéolos pulmonares, o que levou à resolução do processo inflamatório pulmonar induzido pelo metal (WANG, et al., 2002a). Comparativamente, em outras linhagens celulares como células monoblastóides humanas U937 a interação de nanopartículas de TiO_2 em suspensão (<100nm) promoveu modificações celulares apoptóticas e necróticas (VAMANU; CIMPAN; et al., 2008). No estudo anteriormente citado, de Gonçalves e colaboradores (2010) o efeito anti-apoptótico em neutrófilos foi correlacionado a eventos de rápida fosforilação com a expressão de duas MAPKinasas, ERK-1/2 e p38, envolvidas na regulação da apoptose (GONÇALVES et al., 2010).

A família de proteínas cinase ativadas por mitógenos (MAPK) desempenham importante papel na regulação da sobrevivência celular (REDDY; NABHA; ATANASKOVA, 2003; WIDMANN et al., 1999). Ela é composta de três conjuntos de proteínas: cinase receptora extracelular (ERK) ligada à proliferação, diferenciação e sobrevivência celular e as proteínas p38-MAPK e c-JUN N- proteína cinase terminal

ativada por estresse (JNK/SAPK), que são ativadas em resposta a choque térmico (*heat shock*), hiper-osmolaridade, radiação UV, inibidores de síntese de proteínas ou citocinas inflamatórias, e suas funções estão relacionadas com respostas a sinais inflamatórios e estresse (WIDMANN et al., 1999). Suzuki e colaboradores afirmaram que ERK e p38 MAPK estão relacionadas à produção de ânion superóxido e adesão em neutrófilos estimulados por TNF e G-CSF. Essas proteínas são clivadas e degradadas durante a apoptose de PMNs dependente de caspases e concluíram que isso pode levar a respostas deficientes a estímulos por citocinas inflamatórias. A deficiência na resposta por neutrófilos apoptóticos é fisiologicamente importante por prevenir dano tecidual excessivo ou indesejável (SUZUKI et al., 2001).

Comparativamente Kang e colaboradores (2009) observaram que nanopartículas de TiO_2 ativaram p38 e JNK em linfócitos, desencadeando via apoptótica que envolveu caspase-8/Bid, caspase-9, caspase-3 e poli(ADP-ribose) polimerase (PARP). PARP atua na detecção e reparo do DNA, sendo clivado por caspase-3 e caspase-7 (KANG, S. et al., 2009). Quando células epiteliais de brônquios (16HBE14o e primárias) foram incubadas com NPs de TiO_2 (15nm) e de Carbono Black (CB), (13nm), distintas vias de apoptose foram observadas. Ambas NPs (TiO_2 e CB) promoveram apoptose por ativação de caspases e fragmentação do DNA. Enquanto CB promoveu desestabilização do potencial de membrana mitocondrial com ativação de BAX e liberação do citocromo c da mitocôndria, as NPs de TiO_2 promoveram peroxidação de lipídios, desestabilização da membrana do lisossomo levando a liberação de catepsina B e subsequente ativação de caspases e os demais eventos de apoptose (Figura 3), (HUSSAIN et al., 2010).

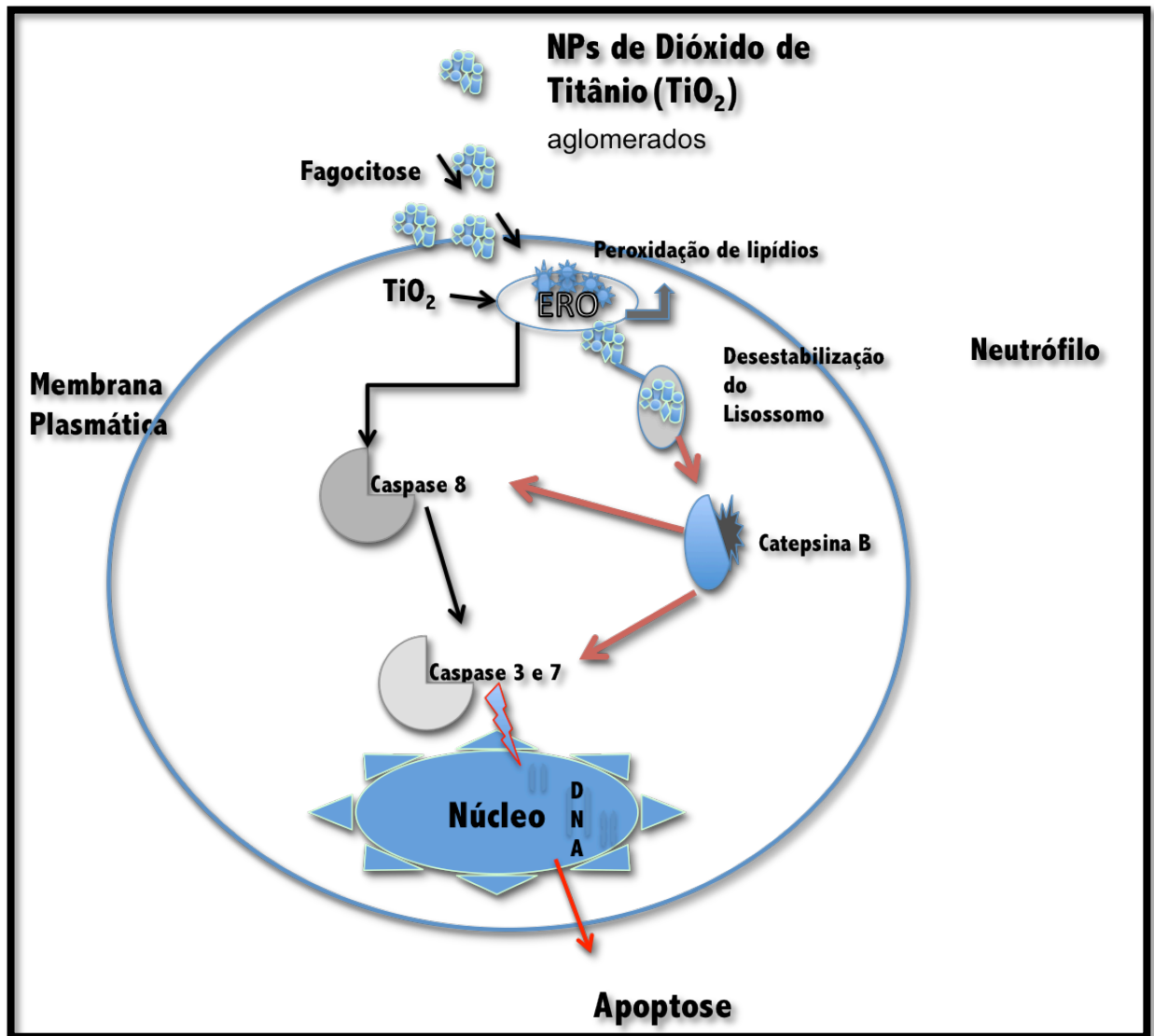


Figura 3- Esquema de vias de apoptose por NPs de TiO₂

TiO₂ promove apoptose por peroxidação de lipídios, desestabilização da membrana do lisossomo com liberação de catepsina B e subsequente ativação de caspases e fragmentação do DNA, *Hussain et al, 2010*.

1.11 Métodos para a Avaliação da Ativação dos Neutrófilos

1.11.1 Citometria de Fluxo

Essa tecnologia é usada para análise simultânea multiparamétrica das propriedades físicas e químicas de células e organelas celulares, que fluem em uma suspensão celular hidrodinâmica por segundo.

Os citômetros de fluxo, como são chamados os equipamentos utilizados para esse fim, têm como princípio básico aspirar células ou partículas de uma suspensão previamente preparada e forçá-las a passar por uma câmara especial (*flow cell*) que faz com que as células fiquem envolvidas e centralizadas num fluxo contínuo de líquido (*sheath fluid*) e saiam dessa câmara uma atrás da outra de modo que uma única célula seja interceptada pelo laser (FULWYLER, 1965). Uma vez interceptada pelo laser, dois tipos de fenômenos físicos ocorrem e fornecem informações da célula. Primeiro, uma parte da luz é espalhada (*scatter*) de acordo com as características morfológicas e estruturais da célula. O *Forward Scatter Cell* (FS) se relaciona com o tamanho e o *Side Scatter Cell* (SSC) com a granularidade da célula ou partícula. Segundo, as células previamente coradas com fluorocromos, uma vez excitadas pelo laser, emitem luz de acordo com suas características fluorescentes e são utilizadas para se examinar aspectos bioquímicos, biofísicos e moleculares das células (BERTHO; SANTIAGO; COUTINHO, 2000; CÔRTE-REAL et al., 2002).

Essa técnica tem sido utilizada amplamente para avaliar a atividade fagocítica de macrófagos e neutrófilos e produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO), (BASSO; LAERUM; SOLBERG, 1983). A explosão respiratória nos neutrófilos gera ERO pelo sistema NADPH oxidase com a produção de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio que tem a capacidade de reduzir ou oxidar substratos em produtos fluorescentes (ROOTS; METCALF, 1977). A Dihidrorodamina 1,2,3 após penetrar no Citossol é reduzida a um composto fluorescente, a rodamina, e as células fluorescentes são então contadas e quantificadas pela citometria de fluxo (ROTHER et al., 1991). Marcadores de membrana específicos, como CD-32 que não são expressos por eosinófilos podem ser usados para separar neutrófilos de eosinófilos. A citometria de fluxo pode ainda avaliar a heterogenicidade de uma população celular e facilitar a identificação e caracterização de um compartimento subcelular e de uma subpopulação (CONKLYN; NEOTE; SHOWELL, 1996).

1.11.2 Teste do Nitroblue Tetrazolium (NBT)

Outro método de controle da ativação celular é representado pelo teste de Redução do NBT, através da mensuração da reação entre o radical superóxido e o NBT, formando o precipitado de Formazan. A contagem é feita por visualização direta de grânulos com coloração azulada ou enegrecida conseqüente à redução do NBT, intra-citoplasmática ao microscópio óptico (Figura 4). A redução do NBT pode ser utilizada como marcador indireto da atividade de fagocitose pelos neutrófilos e monócitos. O NBT é um corante com baixo potencial redutor mas que produz um produto intensamente corado quando reduzido, o Formazan. O NBT é facilmente captado pelos neutrófilos e é reduzido no interior da mitocôndria (DUBANIEWICZ; DUBANIEWICZ; HOPPE, 2004; LATIFYNIA et al., 2009).

Baehner & Nathan(1967) foram os primeiros a observar que o corante NBT foi reduzido em neutrófilos e que houve aumento dessa redução durante a fagocitose. Os neutrófilos de pacientes com Doença Granulomatosa Crônica da Infância (CGDC) apresentaram pequenas taxas de redução do corante, na presença ou ausência de estímulo de fagocitose (BAEHNER; NATHAN, 1968; SEGAL; LEVI, 1975) (SEGAL; LEVI, 1975).

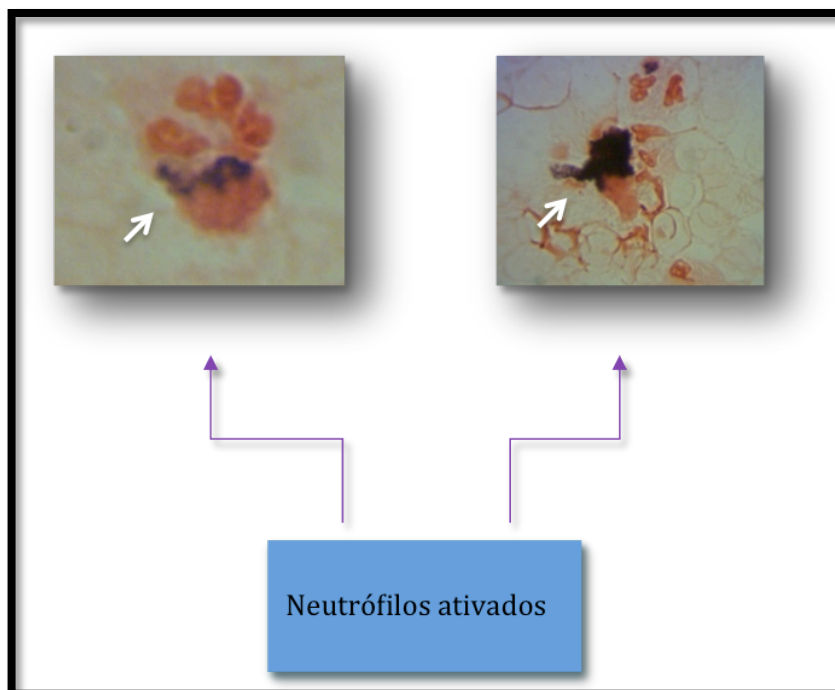


Figura 4- Característica da ativação do neutrófilo pelo NBT por microscopia de luz.

1.12 Microscopias

1.12.1. Microscopia de Luz

A microscopia óptica ou de luz tem sido utilizada em vários experimentos para análise de tecidos e células , em imunologia , inflamação BIER (1990); (FERREIRA; LORENZI; NETO, 1996; OPPENHEIM; SHEVACH, 1990). Os PMN neutrófilos podem ser analisados por M.O. para a contagem e viabilidade celular em experimentos laboratoriais(GABRILOVICH, 2005) ou em ensaios de quimiotaxia e quimiocinese (SMITH et al., 2007), polaridade e locomoção (SEVEAU et al., 2000), ativação, polarização e migração (SENGUPTA et al., 2006).

1.12.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O Microscópio eletrônico de varredura é um dos mais versáteis instrumentos disponíveis para a observação e análise das características microestruturais. Um microscópio eletrônico de varredura (MEV) utiliza um feixe de elétrons no lugar de fótons utilizados em um microscópio óptico convencional, o que permite solucionar o problema de resolução com a fonte de luz branca (DEDAVID et al., 2007).

Apresenta como característica a alta resolução onde estruturas da ordem de nanômetros (1 nm a 20 nm) podem ser analisados pelo MEV com uma aparência tridimensional da imagem das amostras, resultado direto da grande profundidade de campo (WATT, 1997).

O princípio de um microscópio eletrônico de varredura consiste em utilizar um feixe de elétrons de pequeno diâmetro para explorar a superfície da amostra, ponto a ponto, por linhas sucessivas e transmitir o sinal do detector a uma tela catódica cuja varredura está perfeitamente sincronizada com aquela do feixe incidente.

A análise por M.E.V. permite avaliar a estrutura morfológica dos neutrófilos, caracterizando sua superfície tanto no estado quiescente (TAMURA et al., 2002) quanto no estado ativado (TOMCZOK et al., 1996).

1.12.3 Microanálise por dispersão de RX

A microanálise eletrônica elementar por dispersão de RX consiste na medida de raios-X característicos emitidos de uma região microscópica da amostra bombardeada por um feixe de elétrons. As linhas de raios-X característicos são específicas do número atômico da amostra e o seu comprimento de onda ou sua energia podem ser utilizados para identificar o elemento que está emitindo a radiação. Espectros de raios-X podem ser obtidos para todos os elementos da tabela periódica, com exceção do hidrogênio.

O detector de raios-X e o MEV são concepções alternativas de projeto do mesmo instrumento básico, isto é, partem do mesmo princípio físico para resultados diferenciados. A análise por Dispersão de RX (EDS) permite a obtenção de Espectros de raios-X que determinam os elementos químicos presentes nas amostras de determinado neutrófilo, principalmente quando os PMNs interagem com NPs ou partículas de metais como TiO_2 (KUMAZAWA et al., 2002; WATARI et al., 2009)

1.12.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Consiste de uma técnica de microscopia na qual um feixe de elétrons é emitido em direção a uma amostra ultrafina, interagindo com essa amostra enquanto a atravessa. A interação dos elétrons transmitidos através da amostra forma uma imagem que é ampliada e focada em um dispositivo de imagem que é a seguir gravada. capacidade de aumento útil de até um milhão de vezes permite a visualização de moléculas orgânicas, como o DNA, RNA e algumas proteínas (GLAESER, 2008). Experimentos com microscópios (200kV) com resolução pontual de 0,24 nm já conseguem imagens reconstruídas próximas a 0,14 nm (COENE et al., 1992). O emprego de substâncias que contêm átomos pesados, como ósmio, chumbo e urânio permitem obter um contraste entre as estruturas celulares, contribuindo para uma melhor imagem. Esse é um aspecto importante pela possibilidade da formação e superposição de artefatos na imagem, principalmente, quando trabalha-se com nanopartículas metálicas, objeto de estudo desta tese (SWARTZENDRUBER et al., 1995). Além da avaliação morfológica celular, essa técnica permite, a análise ultraestrutural (subcelular) de neutrófilos (grânulos e vesículas) expostos a PMA ou outros estimuladores (ROBINSON, 1985; SAITO et al., 1998; VALANT ; DROBNE, 2011).

1.12.5 Microscopia de Força Atômica

É uma técnica microscópica de varredura da topografia de superfícies utilizando forças de interação atrativas e repulsivas entre os átomos de uma ponteira ou sonda acoplada a um cantilever e a amostra a ser analisada.

Os métodos mais comuns para detectar deflexões do cantilever são o método de alavanca óptica, o método interferométrico, e o método de encapsulamento eletrônico. O método óptico de alavanca é o mais utilizado, uma vez que é o mais simples de implementar. Consiste em focar um feixe de laser sobre o lado de trás do braço de suporte e na detecção do feixe refletido por meio de um sensor de posição, que é geralmente um fotodiodo (STARK et al., 2003). As ponteiros (sondas, pontas) mais utilizadas atualmente, são de silicone ou nitreto de silício (TORTONESE, 1997). As forças interativas entre a ponteira e amostra podem ser: van der Waals, eletrostáticas, forças de Coulomb, forças de dupla-camada (*double-layer*), forças de solvatação/hidratação, forças específicas e estéricas, forças capilares e forças repulsivas. As forças atrativas são representadas por forças interativas de van der Waals, forças eletrostáticas e químicas (modelos teóricos: potencial de Morse, potencial de Stillinger–Weber e potencial de Tersoff), (SEO; JHE, 2008). Por outro lado, as interações são repulsivas devido a repulsão entre os orbitais eletrônicos dos átomos da superfície da amostra e os da ponta do microscópio de força atômica (forças de Lennard–Jones, forças de Morse, interações de exclusão de Pauli, interação elétron-elétron de Coulomb), (CAPPELLA; DIETLER, 1999). A força anula-se quando a distância entre os átomos é da ordem de alguns ångstroms (característica de uma união química), (COSTA; CHINAGLIA, 2010; GIESSIBL, 2003; SEO; JHE, 2008). Existem três modos básicos de operação no microscópio de força atômica: contato, não-contato e dinâmico. Para o estudo dos três modos básicos de operação nesse microscópio as referências a seguir podem ser consultadas (ALESSANDRINI; FACCI, 2005; BRAGA; RICCI, 2003; SEO; JHE, 2008; COSTA; CHINAGLIA, 2010, MARTIN; WILLIAMS; WICKRAMASINGHE, 1987, SEO; JHE, 2008).

O Microscópio de Força Atômica opera do seguinte modo: a amostra, fixada em um disco metálico, é presa por um ímã sobre um bloco de cerâmica piezoelétrica, com uma precisa capacidade de movimentação. Um cantilever (haste), (dimensões: 30 µm x 1 µm x 100 µm), (SEO; JHE, 2008) com a ponta de prova em uma de suas

extremidades se aproxima da amostra. A base de cerâmica piezoelétrica movimenta a amostra, e a interação ponta-superfície da amostra faz com que o cantilever flexione para cima ou para baixo seguindo os contornos da superfície analisada. Através de um sistema de retroalimentação, a força de interação é mantida constante. O deslocamento vertical (eixo Z) do cantilever é virtualmente igual à morfologia da superfície da amostra sob a ponta (FOK; TANG, 2008). Um feixe de laser incide na parte superior do cantilever, sendo refletido até um sensor (fotodiodo) que detecta os movimentos. Um esquema básico de operação de um MFA está representado na Figura 5.

Uma unidade de controle, conectada ao microscópio e a um microcomputador, processa as informações e gera imagens tridimensionais com resolução nanométrica (2nm no plano xy e 0,1nm na direção z). O preparo das amostras é muito simples, sem qualquer procedimento especial, podendo ser varridas em meio gasoso ou líquido (BRAGA; RICCI, 2003 ; COSTA; CHINAGLIA, 2010).

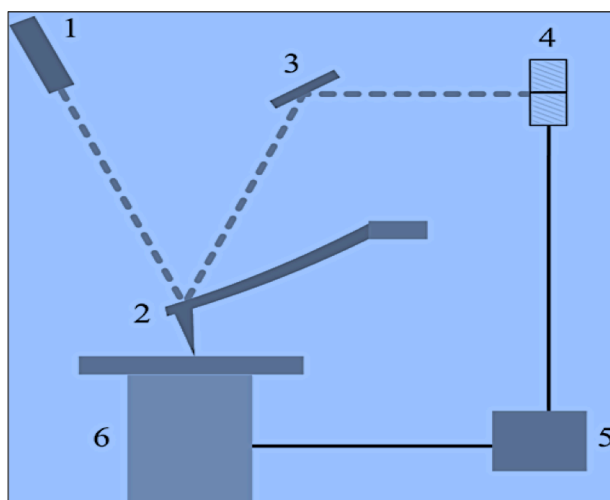


Figura 5- Esquema de operação de um MFA: A base de cerâmica movimenta-se (direção XY). 1-Laser diodo; 2- cantilever; 3-espelho; 4- fotodetector (sensível a posição); 5- parte eletrônica e 6- base de cerâmica com amostra. Modificado de Braga, Ricci (2003), (BRAGA; RICCI, 2003).

1.12.5.1 Espectroscopia de Força Atômica

Em Microscopia de Força Atômica o estudo da relação entre força e a distância chama-se espectroscopia de força. A técnica mede a força (atrativa ou repulsiva) local que atua na ponteira ou sonda exercida por uma amostra com resolução

especial em escala nanométrica. Enquanto a microscopia de força atômica obtém imagens pela varredura da superfície da amostra na direção XY, a espectroscopia de força é realizada pela aproximação e retração da ponteira (ou amostra) na direção Z (vertical), (HAN; SERRY, 2008). A curva de distância–força é um gráfico da interação ponteira-amostra versus a distância ponteira–amostra. Experimentalmente, mede-se a deflexão z_c do *cantilever* como função do movimento z_a da amostra na direção z, perpendicular à superfície da amostra, obtendo-se assim um gráfico $z_c(z_a)$. A força F é então obtida multiplicando a deflexão do *cantilever* pela constante de mola k.

$$F = k z_c.$$

Desprezando deformações elásticas da amostra e da ponteira, em especial no regime de contato, a distância d de interação entre a ponteira e a amostra, é dada por:

$$d = z_c - z_a .$$

Portanto, os gráficos $z_c(z_a)$ medidos, podem ser diretamente traduzidos em curvas força-distância.

Em uma representação gráfica experimental de $z_c(z_a)$, isto é, da aproximação ponteira- amostra, para uma dada força $F(s)$.

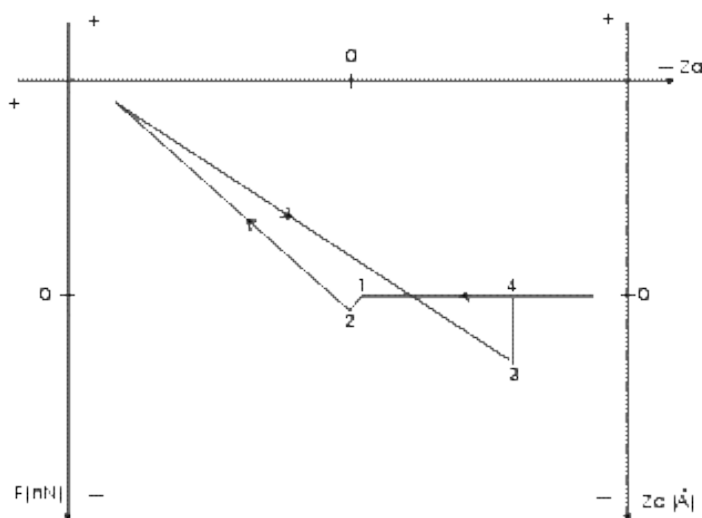


Figura 6- Deflexão do *cantilever* em função do movimento vertical da amostra.

Quando a amostra se aproxima da extremidade do *cantilever*, este se dobra na direção da amostra (z_c negativo) devido à força atrativa (sinal negativo). No **ponto 1**, o gradiente da força atrativa supera a constante k do *cantilever*, o que leva a uma instabilidade que resulta em um **pulo** ao contato, no **ponto 2**. A maior deflexão do *cantilever* na direção para a frente no ponto 1, multiplicada pela constante de mola, é a máxima força atrativa F_{at} existente no sistema. Se a amostra continua a ser movida na direção da ponteira até atingir uma força de carga F_c predeterminada, o *cantilever* sente as forças repulsivas do contato e se flexiona na direção contrária à anterior. A inversão da direção do movimento da amostra, ou seja, a amostra se afasta da ponteira, chega um momento em que a direção do movimento do *cantilever* também muda. Nessa volta, no ponto 3, ocorre uma segunda instabilidade pois o gradiente de força novamente iguala a constante efetiva de mola e a ponteira pula para fora do contato. O ponto 3, portanto, corresponde à posição de máxima força F_{ad} de adesão. Em geral, o módulo da máxima força adesiva no ponto 3 é maior que o módulo da máxima força atrativa no ponto 2 (Figura 6), (COSTA; CHINAGLIA, 2010; OWEN, 2006).

A deflexão do cantilever em conjunto com a penetração da ponteira na amostra mantém a complexa resposta mecânica do complexo cantilever–amostra, os quais são representados por modelos mecânicos sendo o de Hertz mais utilizado, ou por mecânica de contato de Sneddon. O modelo de Hertz descreve a deformação elástica de dois materiais perfeitamente homogêneos e flexíveis que estão em contato. Outro modelo usado para estudar propriedades celulares elásticas através dos dados da espectroscopia de força é o da teoria de conchas elásticas (A-HASSAN et al., 1998). Entre outros modelos teóricos usados na análise das características mecânicas da célula ainda pode ser mencionado o modelo do elemento finito (OHASHI et al., 2002). As potenciais aplicações da espectroscopia de força incluem a caracterização de moléculas específicas sob carga de tensão ou torção, interações células-célula (OWEN, 2006; SMITH, 2004), e interações de superfícies com moléculas (STARODUBTSEVA et al., 2007).

A espectroscopia de força (análise de curva de força) é a técnica básica de AFM para o estudo quantitativo das características mecânicas das células e tecidos. Análises da superfície celular por técnicas de AFM podem revelar heterogeneidades de propriedades mecânicas da superfície a nível nano e também das camadas

internas. A resolução do AFM, ao ar ambiente, na direção vertical é de aproximadamente 0,1-0,5 nm e na direção horizontal de 1-5 nm, dependendo da dureza da amostra. A resolução horizontal pode ser resolvida em células vivas em meio aquoso numa faixa no nível de dezenas de nanômetros de acordo com a textura da membrana celular. A sensibilidade e resolução do método de AFM dependem tanto das características da ponta quanto do cantilever (por ex. raio, forma e material). A espessura da membrana celular é conhecida em torno de 5-10 nm, ao analisar a sua heterogeneidade pelas técnicas de AFM é possível criar a figura da estrutura celular em certas regiões numa célula individual (ALESSANDRINI; FACCI, 2005; KUZNETSOVA et al., 2007).

Evidenciando-se as propriedades mecânicas dos neutrófilos verifica-se que ao longo dos anos várias técnicas foram utilizadas para esses fim, como aspiração com micropipetas (HE; XU; ZHU, 2007; HOCHMUTH, 2000) e citometria de torção magnética (MTC), (FABRY et al., 2003). Entretanto, a nanoindentação permite investigar as propriedades mecânicas da superfície celular em escala nanométrica (HAN; SERRY, 2008). A força de curva representa a base para estimativa do módulo de Young (elasticidade) da célula. As células apresentam uma característica mecânica heterogênia por sua composição com membrana celular e organelas intracelulares (KUZNETSOVA et al., 2007; SMITH, 2004), como a maior rigidez apresentada pelo núcleo em células endoteliais de veias umbilicais (MATHUR; TRUSKEY; REICHERT, 2000).

A reologia dos neutrófilos foi investigada por Lee et. al., (2011) os quais demonstraram que o corpo dos neutrófilos foi significativamente mais rígido do que as regiões próximas da lamelipódia, enquanto as regiões específicas da lamelipódia e da uropódia foram mecanicamente indistinguíveis, sugerindo que um menor módulo de elasticidade na lamelipódia favorece a flutuação elástica dos filamentos de actina levando a ativa protrusão durante a resposta imune (LEE; PATEL; PARK, 2011). Rosenbluth et al., (2006) comparando neutrófilos, células mielóides (HL60) e linfóides (Jurkat), relataram que existe um efeito significativo do tipo de célula quanto a rigidez. Os neutrófilos foram significativamente mais flexíveis do que as células HL60 e significativamente mais rígidas do que as células Jurkat (ROSENBLUTH; LAM; FLETCHER, 2006). Roca-Cusachs et al., (2006) avaliaram por MFA a reologia de neutrófilos quiescentes e ativados . A ativação dos neutrófilos resultou em

aumento da rigidez na superfície celular e sua reologia foi dependente do córtex celular. O processo de deformação morfológica rápida, em função da ativação implica em elevada rigidez, o que facilitaria a retenção de neutrófilos nos capilares e subsequente adesão. Concluíram que o aumento da rigidez com frequência pode modular o trânsito, retenção, e transmigração na microcirculação vascular. Fok e Tang (2008) investigaram a dureza de neutrófilos fixados em lâminas de vidro, por MFA. Para tanto realizaram o mapeamento de forças para obter um conjunto de curvas de força pelo modelo hertziano visando estimar o módulo de Young. Durante os experimentos enfatizaram que somente o segmento de aproximação da curva de força foi utilizado para o cálculo, porque o segmento de retração contém informações das forças de adesão. Ainda ressaltaram que no gráfico da curva a diferença entre a aproximação e a retração representa histerese, a qual é causada pela viscoelasticidade da célula. O módulo de Young obtido foi 28886 Pa, uma média calculada a partir de três regiões da célula (FOK; TANG, 2008). Enquanto Rosenbluth et al. (2006) obtiveram um módulo de Young de 156 ± 87 Pa (ROSENBLUTH; LAM; FLETCHER, 2006), Lee et al. (2011) obtiveram na região central $1,548 \pm 871$ Pa, na área próxima a lamelipódia 686 ± 801 Pa e na transição da lamelipódia com a uropódia 494 ± 537 Pa (LEE; PATEL; PARK, 2011).

Alguns parâmetros da análise da curva de força como *snap in force*, *maximum load force*, *detachment force*, *Young's modulus*, e *dissipated energy* podem ser utilizados para análise nanomecânica celular na direção Z. *Max Pull Force* é a força máxima de tração na curva de retração. Frequentemente será idêntica a *detachment force* (Detach Force). *Snap-in Force* é a magnitude de força imediatamente após contato ponteira-amostra (snap in). Assim que a ponteira aproxima-se da superfície da amostra (distância de nanômetros ou atômica), forças de pequena magnitude como *van der Waals* ou capilares podem ser medidas. Quando a soma dessas forças tornam-se atrativas a ponteira entrará em contato com a superfície e este efeito refere-se ao snap-in (OWEN, 2006). *Max Loading Force* é a força máxima de carga geralmente na extremidade esquerda da curva de força. Ela é medida no momento de máxima deflexão do cantilever registrado pelo detector. A sensibilidade do sistema é previamente calibrada com um material mais rígido que as células para obtenção da sensibilidade do instrumento (medida em nm/V).

A Força de separação (*Detach Force*) é a força antes do último evento na curva de retração, que corresponde ao ponto em que a ponteira perde contacto com a

superfície da amostra. *Módulo de Young* representa o módulo de elasticidade sendo calculado por um dos modelos de indentação na curva de força versus retração. A sensibilidade do cantilever é o fator utilizado para o cálculo dos parâmetros. Pode ser calculado automaticamente e, portanto, diferente para cada curva de força. Diferentes geometrias das ponteiros levam a diferentes raios de contato sobre a amostra (ponteiros esféricas x ponteiros piramidal). A rigidez do cantilever deve estar na ordem de dureza da amostra. Para uso com células a constante de mola deve ser de 10-30 N/m. Para amostras mais rígidas como gel de agarose a constante de mola deve ser de 30-100 N/m ou maior (NEUMANN, 2009).

Assim, como evidenciaram Kuznetsova et al., (2003) e Neumann (2009) a heterogeneidade da amostra pode resultar em artefatos nesse parâmetro como a variação desse módulo dependendo da profundidade de indentação na razão direta do componente celular que está abaixo da membrana (glycocalix, extensões da membrana, núcleo ou organelas) resultando em diferentes valores de dureza. (KUZNETSOVA et al., 2007; NEUMANN, 2009). A Energia dissipada (*dissipated Energy*) representa a energia calculada como a área entre a curva de aproximação e a curva de retração da curva de força versus separação. Em locais onde a força de retração excede a curva de aproximação essa área é considerada como negativa (HOFFMANN et al., 2001, VORDEN; MOLLER, 2011).

1.13 Proteômica

É a ciência que estuda o conjunto de proteínas expressas a partir de um genoma, em resposta a uma determinada situação, contidas em um compartimento ou fluído e submetidas a eventuais modificações pós-traducionais (SILVA; CORREA, 2007). Utiliza métodos diretos para identificar, quantificar e estudar as modificações pós traducionais das proteínas em uma célula, tecido ou mesmo organismos (WESTERMEIER; NAVE, 2002). O termo já sofreu diversos ajustes desde que foi introduzido na literatura por Marc Wilkins e Keith Williams em 1995 (SOUSA et al., 2001). Normalmente 80% ou 90% dos polipeptídeos de um proteoma celular correspondem a componentes das redes metabólicas e dos elementos estruturais da célula, sendo encontrados, embora em diferentes quantidades, em todos os tipos de células (WILKIN; PASQUALI; APPEL, 1996). Os estudos de análise proteômica complementam os dados de análise e seqüenciamento de genomas, auxiliando na compreensão do funcionamento e

regulação celular, representando a ponte de ligação entre o genótipo e o fenótipo de um organismo. Atualmente, estudos têm sido realizados para a obtenção de mapas proteômicos de neutrófilos quiescentes, estimulados e ativados, (AQUINO, 2008; CAMPOS, 2007; CASTRO et al., 2006; SANTOS, 2007) ou mesmo de estruturas subcelulares (LOMINADZE et al., 2005).

A análise proteômica permite saber se um produto gênico está sendo expresso, a concentração relativa (ou absoluta) desse produto e as modificações pós-traducionais que podem ocorrer nessas proteínas. Além disso, o proteoma pode mostrar como os processos metabólicos, regulatórios e de sinalização se tornam disfuncionais em dados estados patológicos e como podem ser manipulados na busca por soluções terapêuticas (ANDERSON; MATHESON; STEINER, 2000).

O estudo proteômico divide-se basicamente em duas etapas: a primeira consiste na extração e separação das proteínas a partir do material de origem, baseando-se em propriedades intrínsecas de cada proteína como a massa molecular e o estado de suas cargas; e a segunda na identificação e quantificação de cada proteína usando técnicas de espectrometria de massa (SANTOS, 2007).

Diversas técnicas podem ser utilizadas para a realização de tais etapas. No presente estudo optou-se pelo uso da eletroforese bidimensional para a separação de proteínas e pela espectrometria do tipo *MALDI-TOF/TOF* para a identificação de proteínas com base nas massas de seus peptídios e seus respectivos padrões de fragmentação. Tal escolha baseou-se principalmente na existência prévia de géis de proteínas de neutrófilos expostos a outras condições, o que viabilizará comparações futuras.

1.13.1 Eletroforese Bidimensional

Nesta técnica a separação dos componentes de uma amostra ocorre de acordo com duas propriedades independentes, em dois passos: (1) primeira dimensão – focalização isoeletrica (IEF); e (2) segunda dimensão – gel de poliacrilamida – SDS (SDS – PAGE). No primeiro passo as proteínas são separadas de acordo com o ponto isoeletrico (pI) das proteínas. Na segunda dimensão, a separação ocorre baseada no peso molecular (*MW*). Dessa forma, em apenas uma corrida, milhares de proteínas podem ser separadas e, além disso, podem ser obtidas diversas informações, como ponto isoeletrico, peso molecular e quantidade de cada proteína detectada (NEVES, 2010).

1.13.2 Análise de Imagens

Este tipo de análise é muito útil para se comparar cada proteína ou conjunto de proteínas (*spots*) visualizadas em vários géis. O programa de computação, *Image Master Platinum GE®* (MACHADO et al., 2010), agrupa os géis de acordo com a condição experimental, por exemplo, antes e após um estímulo, e depois se faz um pareamento entre os géis de cada condição e entre os géis representativos das duas condições. Essa ferramenta também permite a quantificação de cada spot, gerando dados de proteínas diferencialmente expressas em cada condição e de proteínas ausentes ou presentes em apenas uma das condições estudadas.

1.13.3 Espectrometria de Massa

Os *spots*, visualizados pela coloração (ex.: prata), num gel *2D-PAGE*, são cortados e digeridos, geralmente pela enzima tripsina, originando peptídeos que se ionizam em um espectrômetro de massa e terão suas massas moleculares, bem como regiões de sua sequência determinadas. O conjunto de massas moleculares e trechos de sequência dos peptídeos é comparado a conjuntos teóricos obtidos de cada uma das proteínas presentes num banco de dados. A proteína cujo padrão de digestão teórica for mais similar ao obtido experimentalmente é considerada identificada.

Um espectrômetro de massas é um instrumento analítico que converte componentes de uma amostra em íons gasosos e mede suas massas. Em um espectrômetro de massas, os íons são separados de acordo com sua relação massa/carga (m/z). A massa dos íons é medida por unidades de massa atômica (u.m.a.) ou Daltons (Da), os quais são definidos como 1/12 da massa de um átomo de C_{12} . O espectrômetro de massas consiste-se de cinco componentes principais: sistema de injeção de amostra, fonte de íons, analisador, detector e processador de sinais.

No presente trabalho foi utilizado um espectrômetro do tipo *MALDI-TOF-TOF* (*MALDI* – *matrix-assisted laser desorption ionization* ; *TOF* - *time of flight*). A ionização por *MALDI* usa pulsos de *laser* os quais excitam uma matriz que é, adsorvida aos peptídeos das proteínas digeridas. A matriz adsorvida aos peptídeos

é convertida em uma fase gasosa contendo íons, o que induz a ionização dos peptídeos. Esses íons são então acelerados em um campo elétrico, para serem posteriormente detectados. O tipo de análise chamado *TOF* mede a razão massa/carga de um íon peptídico de acordo com o tempo que ele percorre uma região livre de campo elétrico até o detector (VORM; ROEPSTORFF; MANN, 1994). Depois dessa etapa, segue-se a análise da impressão digital de fragmentos peptídicos (*peptide mass fingerprinting*). Uma série de massas de peptídeos, obtidas por análise de espectrometria de massa, pode servir como uma impressão digital, pois o digesto triptico é específico para cada proteína (KUMARATHASAN et al., 2005). Portanto, uma série de massas determinadas a partir de *MALDI-TOF* é comparada com aquelas calculadas a partir da digestão teórica de seqüências existentes em bancos de dados disponíveis na *Internet*, levando à identificação da proteína. Tal identificação pode ainda ser aperfeiçoada (ex.: *MALDI TOF-TOF*) acrescentando-se ao conjunto de massas de peptídeos, fragmentos de seqüência obtidos através de *sequence tags* (trechos de seqüências), o que permite a identificação com apenas um fragmento, ou ainda outros dados obtidos na eletroforese como *pI* e massa molecular aproximada da proteína estudada (ROEPSTORFF, 1997; WILKINS et al., 1997). O princípio do *MALDI-TOF-TOF* é o mesmo, porém os peptídeos selecionados são fragmentados por ação de uma alta energia ou pela colisão de um gás inerte como argônio. Os peptídeos tendem a se romper na ligação peptídica, gerando fragmentos menores. Os fragmentos são novamente acelerados soltos no TOF e detectados cada um ao seu tempo pela diferença de *m/z*. Os sinais também são transformados em espectros contendo picos (ANDERSON et al., 2000).

1.14 Ligação de NPs de Titânio a Proteínas

As NPs rapidamente interagem com as proteínas presentes nos fluídos biológicos, como o sangue. Por sua vez, as proteínas que adsorvem na superfície metálica potencialmente ditam a biocinética das NPs e o seu destino no organismo (DENG et al., 2009).

A ligação de titânio a proteínas está implicada em eventos como a bioatividade de drogas anticâncer (KOPF-MAIER; HESSE; KOPF, 1980, KOPF-MAIER; HESSE; VOIGHTLANDER; et al., 1980; KOPF-MAIER ; KRAHL, 1981), ligação plasmática de reagentes imaginológicos , implantes dentários (ALBREKTSSON, 1985) e interação com a transferrina plasmática (TINOCO; VALENTINE, 2005). Sabe-se que

aproximadamente 40 metais ligam-se à Transferrina mas o Ti tem uma ligação mais estável mesmo quando comparado ao Fe(III), ligante natural dessa proteína (TINOCO; VALENTINE, 2005). Também se observou que as espécies Fe(C)Ti(N)-TF podem fornecer a via de entrada do TiO₂ nas células pelos receptores da transferrinas após a liberação de partículas desse metal de implantes orgânicos (NUEVO-ORDOÑEZ et al., 2011). Além disso, a interação de peptídeos com TiO₂ tem relevante aplicação experimental em proteômica, onde esse metal é empregado na purificação de peptídeos fosforilados para análises em espectrometria de massa acoplada à cromatografia líquida (LARSEN, M. et al., 2006), além de possibilitar a clivagem peptídica e protéica pela formação de radicais OH⁻ após exposição a luz UV (JONES et al., 2007). Deng et al., 2009 demonstraram a ligação de proteínas plasmáticas na superfície de NPs de TiO₂, SiO₂ e ZnO. O período de incubação com plasma foi de até 4 hs. Os resultados para o TiO₂ com géis de eletroforese 2D demonstraram a ligação com: albumina, imunoglobulina (cadeias leve, cadeias pesadas gama e mu), fibrinogênio (cadeias alfa e beta), antitripsina alfa-1, complemento C3, Fetuina A, Glicoproteína ácida alfa 2, apolipoproteína D e clusterina (DENG et al., 2009). Gonçalves et al., 2011 observaram *in vivo* a infiltração de neutrófilos em dorso de ratos (bolsa de ar subcutânea) após injeção de NPs de TiO₂ (100 µg/mL). As NPs promoveram o influxo de neutrófilos para a área inflamada e o exsudato demonstrou a expressão de 40 diferentes analitos como quimiocinas, sendo que MIP-1 teve expressão significativamente maior que os controles (GONÇALVES; GIRARD, 2011).

2 JUSTIFICATIVA

O TiO_2 tem sido utilizado há vários anos com fins biomédicos apresentando excelentes resultados (ALBREKTSSON, 1985; SCHWEISER et al., 2003). Muito embora o TiO_2 seja bem tolerado pelo organismo em macro-escala, é crescente a preocupação em relação a citotoxicidade das NPs desse metal no meio biológico. A incorporação do TiO_2 no organismo pode ocorrer por diferentes vias, como ar, alimentos, medicamentos e em especial por implantes metálicos (próteses ortopédicas, implantes dentários, entre outras). A liberação no organismo de íons e NPs desse metal com a sua respectiva migração para tecidos e órgãos já é fato comprovado pela literatura (JORGENSEN et al., 1999; JORGENSEN et al., 1997; WATARI et al., 2007; SARMIENTO-GONZALES et al., 2009, WANG et al., 2008, WATARI et al., 2009). Assim, o risco de toxicidade tem levado a uma rotina de remoção das placas e parafusos utilizados em seres humanos, pelo receio de acúmulo e migração de NPs desse metal (CASE et al., 1994; LANGFORD; FRAME, 2002), gerando um elevado custo econômico e biológico. Ademais, a preocupação em relação a biocinética, biodistribuição e citotoxicidade conduziu a estudos para analisar, corrosão de superfície (JACOBS et al., 1991; JORGENSEN et al., 1999; JORGENSEN et al., 1997; NORDENRAM; KJELLMAN, 1989), efeitos metabólicos, oncogênicos e anti-oncogênicos (FURST; HARO, 1969; LAI; LEE, 2009) e imunológicos (FURST, 1971) das partículas e NPs de titânio. O TiO_2 em contato com os tecidos promove uma reação inflamatória por mecanismos biológicos ainda não totalmente esclarecidos (NYGREN et al., 1997). Apesar disso a integração do metal ao organismo ocorre normalmente, associada à resolução do processo inflamatório (ERIKSSON; NYGREN, 2001a).

Os neutrófilos, por sua vez, representam a primeira linha de defesa imunológica do organismo e são rapidamente recrutados para as áreas onde o titânio foi implantado, interagindo com esse metal (URBAN et al., 2000). Tanto a ativação desses fagócitos em contato com micropartículas (KUMAZAWA et al., 2002, CHEN et al., 1999) e conseqüente produção de ERO e citocinas, quanto a dissolução passiva e translocação de partículas de TiO_2 já foram demonstrados (JORGENSEN et al., 1999). Entretanto poucos relatos avaliam a interação dos neutrófilos humanos com NPs de TiO_2 (GONÇALVES et al., 2010; GONÇALVES; GIRARD, 2011 ; HEDENBORG, 1988). Atualmente, os ensaios celulares são considerados essenciais para avaliar a toxicidade e a biocompatibilidade de biomateriais, porque

amostras contendo células (*in vitro* ou *in vivo*) podem fornecer uma estimativa da resposta celular frente a um determinado material ou substância (JONES; GRAINGER, 2009).

Assim a pesquisa das interações dos neutrófilos com nanomateriais permite a avaliação e compreensão dos processos de inflamação, reparo, citotoxicidade e do potencial de genotoxicidade mediada por NPs de TiO_2 . Tal conhecimento contribuirá para o desenvolvimento de materiais com características que propiciem maior biocompatibilidade, permitindo ainda a identificação precoce de situações que demandem intervenção médica e para o desenvolvimento de moduladores da resposta a essas partículas. Entretanto os mecanismos de captação bem como os aspectos morfológicos, mecânicos, ultraestruturais e a abundância protéica da interação das nanopartículas de TiO_2 com neutrófilos humanos ainda não foram totalmente elucidados.

O presente estudo propõe a revisão e contribuição para o esclarecimento dos processos biológicos envolvidos na interação dos neutrófilos com nanopartículas de TiO_2 . Nesse estudo as nanopartículas foram caracterizadas por DLS (Dispersão Dinâmica da Luz) e o seu impacto em condições oxidantes intracelulares foi medido pela produção de ânion superóxido. Buscou-se ainda respostas para o mecanismo de adesão e captação (endocitose) das NPs de TiO_2 pela expressão superficial de moléculas de adesão e as potenciais alterações morfológicas e mecânicas celulares e subcelulares assim como abundância protéica decorrente dessa interação. Utilizou-se como ferramentas a análise proteômica, técnicas de microscopias (de luz, de varredura, de transmissão, de força atômica), NBT e citometria de fluxo.

3 OBJETIVOS

- a) Avaliar as alterações na morfologia e no perfil protéico dos neutrófilos expostos a nanopartículas de TiO_2 ,
- b) Avaliar a incorporação de nanopartículas de dióxido de titânio por neutrófilos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Delineamento Experimental

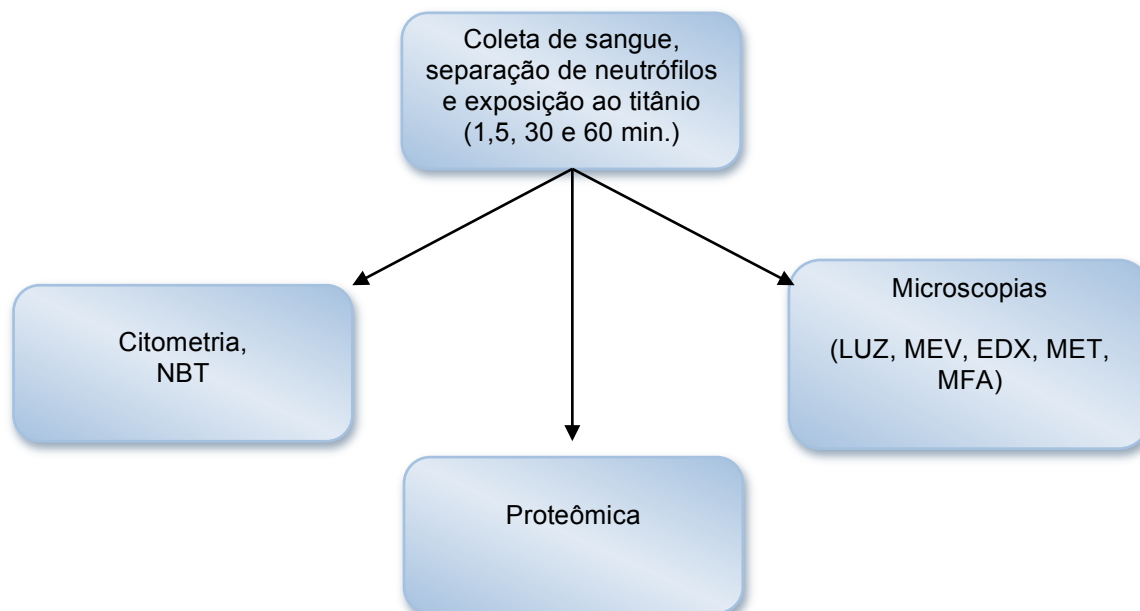


Figura 7- Após a coleta e separação os neutrófilos foram expostos às NPs de TiO_2 nos tempos de 1, 5, 30 e 60 minutos. Após cada um desses tempos a morfologia das células foi avaliada por microscopia de luz, de varredura e de transmissão. As propriedades mecânicas dos PMNs foram analisadas por microscopia de força atômica e a dispersão de RX permitiu a análise da composição das amostras. As moléculas de adesão foram analisadas por citometria de fluxo com marcadores de superfície CD-11b e CD-62L. O teste do NBT permitiu a avaliação da ativação celular pela produção de superóxidos. Finalmente, as amostras lisadas no tempo 30 minutos foram submetidas à análise proteômica.

Para se atingir os objetivos especificados, a seguinte estratégia experimental foi adotada:

- a) Observar e descrever as alterações morfológicas dos neutrófilos humanos em diferentes tempos de interação com nanopartículas de dióxido de titânio por microscopias de luz, de varredura e de transmissão,
- b) Avaliar a ativação, fagocitose e citotoxicidade dos neutrófilos humanos em contato com nanopartículas de dióxido de titânio, por citometria de fluxo, teste do nitroblue tetrazolium(NBT), videomicroscopia, microscopia de luz, de transmissão e análise

elementar por dispersão de Raio X (EDX),

- c) Caracterizar pela análise de marcadores moleculares de estímulo e ativação (anti CD-62L e anti CD-11b) as respostas da interação dos neutrófilos humanos com as nanopartículas de dióxido de titânio,
- d) Caracterizar os efeitos cinéticos das nanopartículas de dióxido de titânio sobre as propriedades nanomecânicas dos neutrófilos humanos *in vitro*, por espectroscopia de força atômica,
- e) Avaliar as proteínas expressas pelos neutrófilos quando da interação com partículas de dióxido de titânio por espectrometria de massas.

4.2 Coleta de Sangue e separação dos neutrófilos em gradientes de *Percoll*.

4.2.1 Coleta de sangue

Foram colhidos 12 mL de sangue periférico de 03 doadores voluntários, sem histórico de doenças crônicas (como asma e diabetes), infecto-contagiosas (hepatite, AIDS, entre outras), alérgicas ou inflamatórias, que não fazem uso de medicamentos e que não incluem em seus hábitos alimentares alimentos ricos em titânio, como biscoitos com corantes artificiais, e que não tenham próteses orgânicas desse metal ou aparelhos dentários ortodônticos. A idade dos doadores variou entre 20 e 50 anos. O material foi colhido em frascos plásticos estéreis, heparinizados.

Os experimentos com células foram realizados com a aprovação do Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (número de registro: CEP-CFM-45/2010), em conformidade com a Declaração de Helsinki. Da mesma forma, os indivíduos adultos participantes do estudo assinaram termo de consentimento para a doação de sangue (Anexo-A)

4.2.2 Separação dos Neutrófilos e análise celular : pureza, viabilidade e rendimento.

Os neutrófilos foram isolados do sangue por meio de centrifugações sucessivas, utilizando-se gradientes de *Percoll*® conforme previamente descrito (TELES et al., 2012). Para os experimentos que demandaram maior número de células (MET, MEV e proteômica) foram colhidos 24 mL de sangue utilizando-se frascos Falcon de 50 mL, para os demais experimentos foram usados 12 mL de sangue e usados tubos Falcon de 15 mL.

O volume coletado (12 mL) foi dividido em 4 tubos, cada tubo contendo 2 gradientes com 60% e 70% (quadro II). Para coleta de 24 mL os reagentes e soluções utilizados na montagem dos gradientes de *Percoll* estão demonstrados na (quadro III).

Quadro II: Reagentes e soluções para montagem dos gradientes (12mL).

| Reagentes | 60% (3 mL) | 70% (3mL) |
|---------------------|------------|-----------|
| <i>Percoll</i> 100% | 1800 µL | 2100 µL |
| <i>HBSS</i> 1X | 990 µL | 645 µL |
| <i>HBSS</i> 10X | 210 µL | 255 µL |

**HBSS*:Hanks' Balanced Salt Solution

Quadro III- Reagentes e soluções para montagem dos gradientes (24 mL)

| Reagentes | 60% (12 mL) | 70% (12 mL) |
|---------------------|-------------|-------------|
| <i>Percoll</i> 100% | 7200 µL | 8400 µL |
| <i>HBSS</i> 1X | 4000 µL | 2666 µL |
| <i>HBSS</i> 10X | 800 µL | 934 µL |

As soluções de Percoll foram depositadas lentamente em tubos de 15 mL com fundo cônico, em gradiente ascendente de densidade a partir do fundo do tubo e a seguir foram adicionados 3mL de sangue. Os tubos foram submetidos a uma força gravitacional de $\sim 600 g$, na temperatura de $22^\circ C$, aceleração e desaceleração de índice 2, por 35 minutos. Após a separação observaram-se no tubo os neutrófilos entre os gradientes de 70% e 60%, com os eritrócitos no fundo, os mononucleares sobre o gradiente de 60% e o plasma sobre os mononucleares (Figura 8). Os neutrófilos coletados (aproximadamente 2 mL) foram colocados separadamente, em outro tubo de 15 ml, onde foi feita a lavagem para retirada do excesso de Percoll. Para isso, adicionou-se 7 mL de *HBSS* 1x às células e a seguir as amostras foram centrifugadas por 12 minutos a uma força gravitacional de $\sim 605,73 g$ (~ 1300 rpm), aceleração e desaceleração de 5, temperatura de $22^\circ C$. Em seguida o sobrenadante foi descartado e foram acrescentados ao pellet 5 mL de *HBSS* 1x, repetindo-se os parâmetros da centrifugação anterior. Após as duas lavagens foi realizada uma etapa de hemólise para retirar a contaminação com eritrócitos residuais, adicionando-se 3 mL de água *Milli-Q* por 20 segundos e a seguir restaurou-se a osmolaridade acrescentando 3 mL de *HBSS* 2x. A amostra foi centrifugada por 12 minutos com força de $\sim 605,73 g$ (~ 1300 rpm), aceleração e desaceleração de 5, temperatura $22^\circ C$. Descartou-se o sobrenadante e ressuspenderam-se os neutrófilos em 1 mL de *HBSS* 1x.

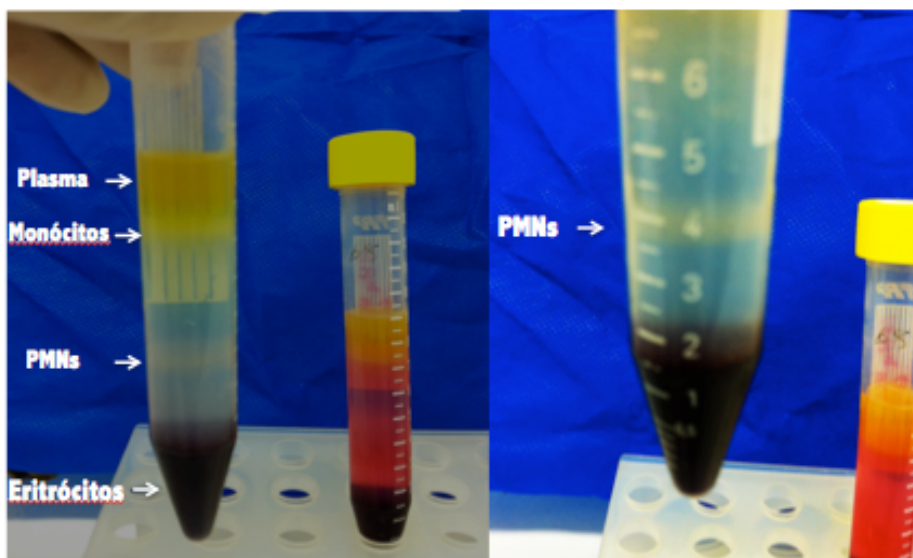


Figura 8- Separação dos neutrófilos

Nas separações com 2 Falcon de 50 mL foram utilizados 12 mL de sangue para cada um deles. A primeira centrifugação foi com 605,73 g (1300 rpm) durante 15 minutos e as subseqüentes centrifugações foram de 745,51 g (1600 rpm) por 5 minutos. Para as lavagens, visando a diluição e retirada do *Percoll*, em ambas as técnicas (12 ou 24 mL de sangue) foram utilizados tubos de 15 mL.

Da amostra com 1 mL de HBSS, três alíquotas foram reservadas para a contagem de células e viabilidade. A contagem celular foi realizada na câmara de Neubauer (Figura 9, A). Obteve-se rendimentos variáveis de $3 - 5 \times 10^6$ (12 mL) e $2 - 5 \times 10^7$ (24 mL). Na seqüência foram retirados 10 μL da suspensão de neutrófilos e adicionados 50 μL de líquido de *Turck*. Após a homogeneização, foram preenchidos os quadrantes da câmara de Neubauer e realizada a contagem de células pela fórmula: $2,5 \times 6 \times (A+B+C+D) = \text{número de células} / \mu\text{L}$, onde A, B, C, D representam os quadrantes da Câmara de *Neubauer* (Figura 9, B).



Figura 9- Câmara de *Neubauer* (A) e seus quadrantes (B).

Para a verificação da viabilidade celular foram adicionados em um eppendorf 5 μL de suspensão de células e 20 μL de solução de nigrosina 0,05% (corante supravital do tipo aniônico que não penetra em células vivas). A seguir, preencheu-se uma área de contagem da câmara de Neubauer com essa solução. Foram contadas 100 células de forma a se verificar a porcentagem de células mortas e vivas. Contaram-se como vivas, as células com núcleo transparente e acúmulo da Nigrosina ao redor da membrana dos PMNs e como mortas, aquelas que apresentaram citoplasma corado de preto, caracterizando a penetração da Nigrosina no citoplasma devido a permeabilidade de membrana. (Figura 10- A e B)

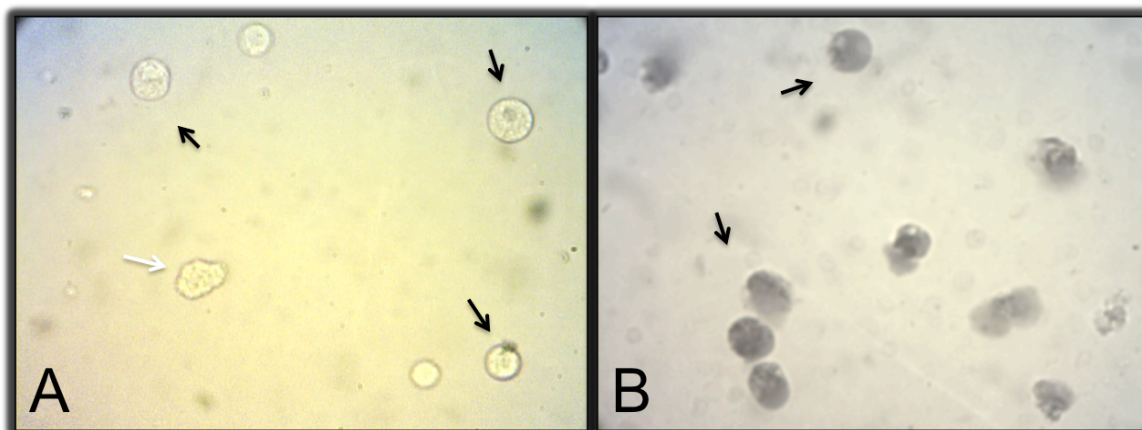


Figura 10- Neutrófilos em HBSS, vivos (setas pretas), neutrófilo vivo com alteração da morfologia (seta branca) com nigrosina 0,05% na membrana celular (halo escuro), (A) e neutrófilos mortos (setas pretas), nigrosina 0,05%) penetrou no citoplasma (B).

4.3 Exposição dos neutrófilos as NPs de TiO₂

As amostras de óxido de titânio puro 99,9% (*Sigma –Aldrich-TiO₂ .reference number 14027, Titanium (IV) oxide puriss.*), foram imersas em 1 mL de água Milli-Q (seringa descartável de 5 mL esterilizada) e a seguir filtradas (filtro *Millipore-Billerica®*, MA-USA) em filtro de porosidade de 0,22 µm (220 nm) de forma que somente partículas menores foram obtidas e acondicionadas em microtubo com 1 mL de H₂O Milli-Q estéril. As suspensões tiveram concentração fixa de 200 µg/mL de TiO₂. As partículas foram analisadas por dispersão de luz dinâmica *Nanotrak U2131I (Microtec Inc –USA, Instrutécnica –SP)*. A figura 27 mostra a distribuição do diâmetro hidrodinâmico das NPs de TiO₂, onde aproximadamente 67% das NPs apresentaram em torno de 180 nm. Para caracterização morfológica das nanopartículas (agregados/alomerados) foram realizados ensaios em lâminas de vidro no microscópio óptico (imagens estáticas por fotografias e dinâmicas por vídeos).

As partículas foram esterilizadas para cada uso em autoclave a 121 °C durante 20 minutos [modificado de ERICKSSON et al., 2001; norma *ASTM F86,2009*] (*ASTM-F86-04, 2009; ERIKSSON; NYGREN, 2001a*). Ainda , antes de cada uso,

para os experimentos, as amostras de partículas metálicas, no interior dos microtubos, foram submetidas a ultrassom (20 KHz, 100 W) durante 15 minutos devido a marcante agregação/aglomeração das NPs de TiO_2 (Figura 11).

Em ambiente de fluxo laminar, os neutrófilos separados, de cada indivíduo, foram divididos em alíquotas. Uma delas permaneceu em repouso no frasco de coleta. Os neutrófilos desse grupo constituíram os controles para cada tempo de exposição dos neutrófilos com as partículas de TiO_2 . Outras alíquotas foram incubadas com a solução de NPs de titânio (40 μL de solução de PMN (10^5) + 20 μL de solução de TiO_2) por um período de 1 minuto (neutrófilos+Ti 1 min.), 5 minutos (neutrófilos+titânio 5 minutos), 30 minutos (neutrófilos+titânio 30 min.) e 60 minutos (neutrófilos+titânio 60 minutos), em temperatura aproximada de 37 °C (Figura 12). As partículas de óxido de titânio foram manipuladas cuidadosamente evitando-se contaminações com outros materiais (ex: pinças de aço, luvas). As células do grupo controle permaneceram no tubo durante os períodos correspondentes a cada grupo. Após decorrido o tempo de exposição, seguiu-se cuidadosa ressuspensão das amostras e coletou-se 10 μL para nova contagem e análise da viabilidade das células com Nigrosina 0,05%, em cada grupo, por microscopia de luz.

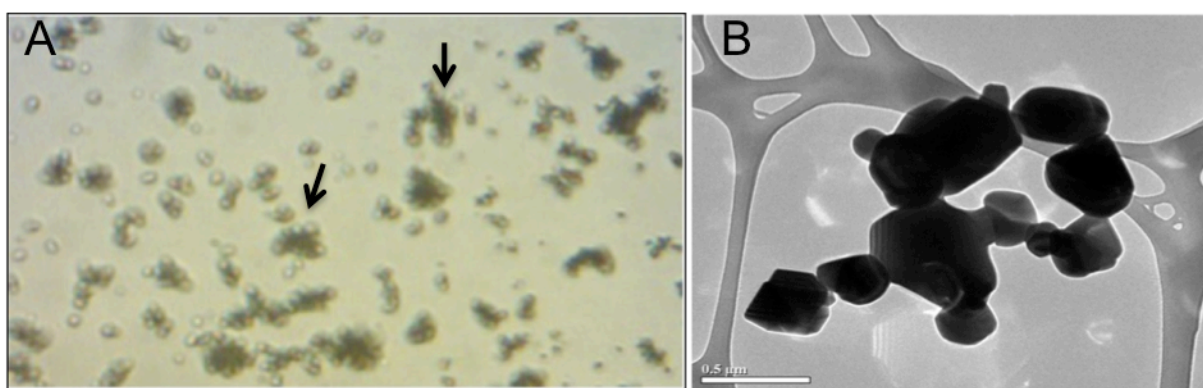


Figura 11- Em (A) nanopartículas de TiO_2 em H_2O Milli-Q (aglomeração/agregação-setas pretas), (Microscopia óptica- 400 x). Em (B) imagens das nanopartículas por MET.

4.4 Métodos para Avaliação da Ativação de Neutrófilos

Alíquotas de cada grupo (1, 5, 30 e 60), apresentando pureza acima de 97% e viabilidade acima de 98% foram selecionadas para avaliação da expressão de receptores de adesão de membrana CD- 62 L e CD- 11b por Citometria de Fluxo. Outro ensaio foi realizado para avaliação da produção de superóxidos (O_2^-) pela redução do NBT (Nitroblue Tetrazolium). Utilizou-se 3×10^5 neutrófilos para cada ensaio por citometria de fluxo) e 1×10^6 para o Teste do NBT-Nitroblue Tetrazolium.

4.4.1 Citometria de Fluxo- avaliação dos receptores de adesão de membrana CD- 62 L e CD- 11b

Após a separação, os neutrófilos foram divididos em 3 alíquotas contendo 3×10^5 em 1000 μ L de volume final de HBSS: Uma alíquota foi exposta a NPs de TiO_2 , (200 μ g/mL por 30 minutos) outra exposta a fMLP (100 nmol/L por 30 min), como controle positivo de ativação e a terceira alíquota, de neutrófilos quiescentes, como controle negativo. As superfícies dos neutrófilos foram avaliadas em relação à intensidade de expressão de L-selectina (CD-62L) e integrina α M, subunidade 11b (CD-11b). A utilização dos marcadores de superfície que demonstram a expressão de L-selectina e CD-11b foi escolhida pelo fato dessas proteínas estarem associadas, respectivamente, ao processo de rolamento (adesão fraca) e firme adesão dos neutrófilos no endotélio vascular (ZARBOCK; LEY, 2008).

Assim que os ativadores foram adicionados, procedeu-se cuidadosa homogeneização e aguardou-se 30 minutos de incubação. Esse tempo foi escolhido por representar um curso de tempo no qual já ocorreu a ativação dos neutrófilos pelas NPs de TiO_2 , fato confirmado pela literatura (GONÇALVES et al., 2010).

A seguir foram alíquotados 200 μ L da suspensão de células (10^6 células) e adicionados 2 μ L do primeiro marcador anti-CD-11b conjugado a R-PE (R-Ficoeritrina), (wt 165-170 kDa) para leitura no canal FL1 (amarelo 575 nm), para avaliar a influência do estimulador na liberação de grânulos específicos, de gelatinase e vesículas secretórias. Do segundo marcador (anti-CD-62L conjugado a FITC (isotiocianato de Fluoresceína), (wt 76 kDa) foram adicionados 2 μ L para leitura no canal FL2 (verde 525 nm) para análise do início do rolamento dos

neutrófilos. Cada solução foi incubada com o marcador por 60 minutos à temperatura de 25°C e realizada a leitura no citômetro.

A fluorescência foi detectada por citometria de fluxo (FACsCalibur, BD Becton Dickinson, Mountain View, Ca, USA), previamente calibrado com feixes fluorescentes disponíveis comercialmente, com uma coleta típica de 10.000 eventos por amostra. O software CellQuest TM, que controla a aquisição de dados foi também utilizado na análise. Neutrófilos isolados foram definidos por suas características morfométricas no forward-scatter (dispersão frontal - FSC) x side scatter (dispersão lateral - SSC) em plots de densidade. A análise estatística comparando as intensidades foi realizada utilizando-se o teste ANOVA.

Quadro IV- marcadores e parâmetros utilizados em CF nos experimentos.

| Marcador | Código (invitrogen) | Canal | Absorbância | Número de células | Volume utilizado |
|----------|---------------------|-----------|-------------|---------------------------------------|-------------------------------------|
| CD11b | CD11b04 | FL2(R-PE) | 575nm | 3 x10 ⁵ (10000 eventos) | 200µL de células 2 µL do anticorpo |
| CD62L | MHCD62L01 | FL1(FITC) | 525nm | 3 x10 ⁵ (10000 eventos) | 200 µL de células 2 µL do anticorpo |

Parâmetros do citômetro de fluxo Scalibur BD.

Programado para um total de 10.000 eventos. Leitura na velocidade HI, caso ultrapasse até 1000 eventos por segundo.

Detectors/Amps

| | | | | |
|----|-----|-----|------|-----|
| P1 | FSC | E-1 | 9.00 | Lin |
| P2 | SSC | 270 | 3.55 | Lin |
| P3 | FL1 | 474 | 1.00 | Log |
| P4 | FL2 | 500 | 1.00 | Log |

Threshold

| Value | Primary Param: | Secondary Param: |
|-------|-------------------|---------------------|
| 52 | Marcado FSC-H | SSC-H |
| 52 | SSC-H | FL1-H |
| 52 | FL1-H | FL2-H |
| 52 | FL2-H | FL3-H |
| 300 | FL3-H | FL4-H |
| 52 | | Marcado None |

Compensation

| | |
|-----|-------|
| FL1 | 2.7% |
| FL2 | |
| FL2 | 19.1% |
| FL1 | |
| FL2 | 0% |
| FL3 | |
| FL3 | 27.9% |
| FL2 | |
| FL3 | 0% |
| FL4 | |
| FL4 | 0% |
| FL3 | |

4.4.2 Teste do NBT-Nitroblue Tetrazolium.

Este teste teve como objetivo confirmar a produção de superóxidos ($O_2^{\cdot-}$) pela redução do NBT (corante amarelo). Após a separação do sangue, os neutrófilos foram ressuspensos em HBSS sem cálcio e magnésio e foi realizada a contagem e viabilidade celular. A seguir foram separadas 1×10^6 células e divididas

em alíquotas controle negativo (quiescentes), controle positivo (fMLP) e o grupo de neutrófilos incubados com TiO_2 por 30 minutos. Foram pesados 0,25 mg de NBT (Sigma-298839) e diluídos em 10 μL de DMSO (Sigma-472301) seguido de agitação (vórtex) por 5 minutos. A solução NBT/DMSO foi ressuspensa em 490 μL de HBSS com Cálcio e Magnésio e nova agitação foi realizada durante 20 minutos. Lâminas de vidro foram separadas para cada grupo e limpas com metanol. Foram misturados 2,5 μL de solução de NBT 40 μL com 1×10^6 células em 3 poços sobre cada lâmina de vidro. A seguir foram adicionados em cada poço 13 μL de uma suspensão contendo 200 $\mu\text{g/mL}$ de NPs de TiO_2 cujo preparo foi previamente descrito e incubadas pelos respectivos tempos, tendo sido o controle incubado em HBSS pelo mesmo tempo de cada condição, correspondentes aos grupos citados acima. A seguir, as amostras foram fixadas com Metanol durante 1 minuto e secas na superfície inferior das lâminas com secador portátil. As amostras foram colocadas em um suporte adequado e coradas com Safranina a 1 % durante 5 minutos. Procedeu-se cuidadosa lavagem das lâminas em água corrente de forma indireta para evitar a retirada das amostras.

Durante a adaptação do teste com NBT concluiu-se que o NBT deveria ser colocado primeiro em contato com as células e somente após deveria ser colocado o ativador (NPs de TiO_2). A contagem foi feita por visualização direta da coloração azulada da redução do NBT a formazan intracitoplasmática no microscópio óptico. Cem células foram contadas e foi considerado neutrófilo positivo, quando este apresentou qualquer grânulo intracitoplasmático de cor azul ou preta, independente do número e tamanho das granulações, bem como aquelas células que tinham distribuição homogênea do corante no citoplasma. Foram realizadas 3 separações de neutrófilos, de indivíduos diferentes em triplicatas para cada indivíduo.

4.4.2.1 Análise estatística

As análises estatísticas foram feitas utilizando o pacote estatístico PASW® v. 13 para Windows®. A porcentagem média de células contadas (ativadas pelas partículas fagocitadas) em cada condição foi analisada utilizando um modelo de ANOVA de medidas repetidas 2×4 . Os fatores analisados foram Condição (2 níveis; Controle e Experimental) e Tempo (4 níveis; 1, 5, 30 e 60 minutos). Usou-se o método de Greenhouse-Geisser para corrigir os desvios da esfericidade. Porém, reportaram-se os valores originais dos graus de liberdade. Quando necessário,

desenvolveram-se análises *pos hoc* utilizando o teste t-pareado ou ANOVA de medidas repetidas de uma via (*one-way*). Nos casos de comparações múltiplas usou-se o método de Bonferroni para correção do nível de significância estatística. Os valores apresentados correspondem à média \pm erro padrão da média. O nível de significância estatística foi estabelecido em 5% ($p \leq 0,05$). Todos os testes foram bicaudais.

4.5 Ensaios para avaliação da capacidade fagocitária dos neutrófilos frente às NPs de TiO₂.

4.5.1 Análise da capacidade fagocitária dos neutrófilos por microscopia de luz

Após a separação dos neutrófilos foi feita contagem em câmara de Neubauer de cem (100) células, em triplicata, de três indivíduos diferentes. As células (1×10^6) foram colocadas em contato com a solução de NPs de titânio (40 μ L solução de PMN + 20 μ L de solução de TiO₂ com concentração de 200 μ g/mL em Água Milli-Q) por um período de 60 minutos em microtubo 1000 μ L e a seguir fixadas e coradas com solução de Wright em lâmina de vidro. Foram consideradas NPs, agregados/aglomerados visualizados por microscopia de luz na região correspondente ao citoplasma. Previamente, foram realizados ensaios (imagens estáticas e dinâmicas) para permitir a identificação das características morfológicas e de imagens das NPs no microscópio óptico.

4.5.2 Análise da capacidade fagocitária e migração dos neutrófilos por Videomicroscopia:

Das células ressuspensas em HBSS (sem Ca^{2+} e Mg^{2+}) foram pipetados 5 μL da solução que continha 1×10^6 células e colocadas em uma lâmina de vidro, sem corantes e recobertas com lamínula de vidro (1,5 x 1,5 cm) e vedada com parafina. A seguir, o conjunto foi colocado na platina zx do microscópio óptico com objetiva 40 x e acoplada uma câmera para microscopia (DinoXcope®) e iniciada a filmagem /gravação ao atingir a temperatura de $\sim 37^\circ\text{C}$, monitorado com termômetro de mercúrio (Figura 12). Imediatamente, foram adicionados por pipetagem 20 μL de solução de TiO_2 e observou-se o comportamento celular durante 35 minutos. As células foram divididas em estacionárias e migratórias. O objetivo do ensaio foi avaliar o comportamento dos PMNs, deslocamentos e eventual fagocitose dos aglomerados/agregados de nanopartículas de TiO_2 . Modificado de SEVEAU et al, (2000) e Grinnell (1992).

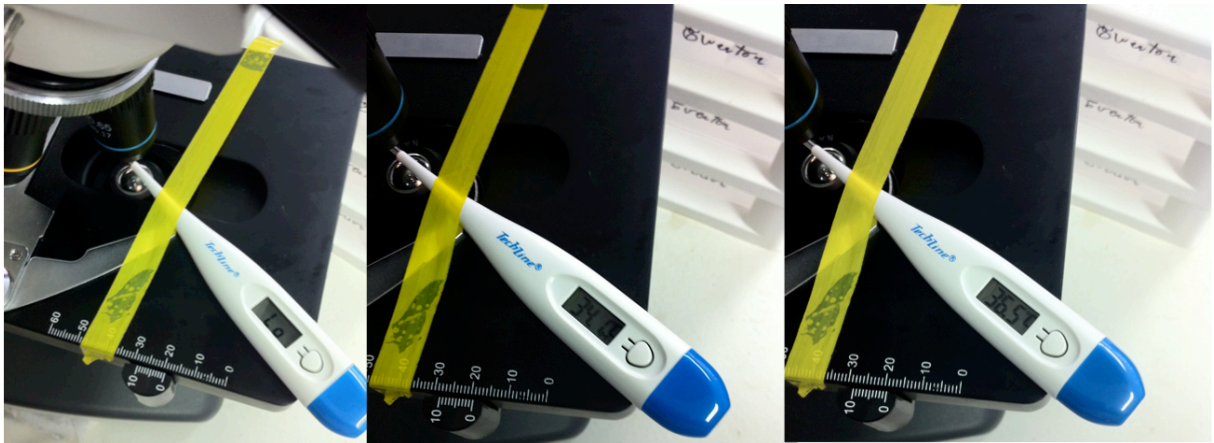


Figura 12- Controle da temperatura na platina do microscópio.

4.6 Análise da Morfologia Celular

Visando avaliar as características morfológicas dos neutrófilos em contato com NPs de TiO₂ ao longo do tempo, utilizou-se microscopia de luz, de varredura e de transmissão.

4.6.1 Microscopia de luz

As características morfológicas das células foram obtidas com o método de coloração Wright e análise por microscopia de luz.

Foram colhidas alíquotas das amostras para cada tempo de exposição às NPs de TiO₂ 1, 5, 30, 60 minutos e seus respectivos controles. A seguir 10 µL de cada amostra foram corados e fixados com solução de Wright (Bioclin –QUIBASA .Belo Horizonte-MG, Brasil) em lâminas de vidro, seguindo-se o protocolo de utilização do produto: o esfregaço foi recoberto com o corante (20 gotas aplicadas com ponteira de 10 µL). Aguardou-se durante um minuto a ação do corante, adicionou-se a seguir 20 gotas de água Milli-Q (com ponteira 10 µL). Após, a mistura corante e água foi homogenizada (por pipetagem) e aguardou-se a coloração das amostras durante três minutos. Decorrido o tempo necessário, a lâmina com as amostras foi lavada em água corrente com pouca pressão. As lâminas foram deixadas, em temperatura ambiente, para secagem em posição vertical e em sequência foram examinadas por microscopia de luz com aumento 400 vezes e no aumento 1000 vezes com óleo de imersão.

Com o microscópio óptico foram obtidas imagens dos neutrófilos controles e ativados por NPs de TiO₂ nos tempos 1, 5, 30 e 60 minutos, o que permitiu a análise da morfologia celular.

4.6.2 Microscopias Eletrônica de Varredura (MEV)

Os neutrófilos foram isolados do sangue total por gradiente de Percoll, conforme a técnica citada anteriormente (AQUINO, 2008). Após a separação a suspensão de células com volume final de 500 µL de HBSS (Sigma-Aldrich-H4385), contendo $1,7 \times 10^7$ foi dividida em 8 alíquotas. Quatro foram incubadas com 20 µL de NPs de TiO₂ em cada microtubo e quatro foram deixadas como controles a 37°C. Após a incubação as células foram fixadas com 100 µL de solução de Karnovsky (12% paraformaldeído + 8% glutaraldeído + tampão de cacodilato 0,1 M) durante 2

horas. A seguir as alíquotas de células foram lavadas com PBS (Sigma-Aldrich-231-791-2) por 5 minutos e centrifugadas 3 vezes (4500g a 4°C). Em continuidade o sobrenadante foi retirado e as células foram incubadas com 1 mL de cacodilato de sódio (0,1M, pH-7,2), (Sigma-Aldrich- 6131-99-3) e levadas para o processamento de MEV.

No processamento das amostras para microscopia de varredura as células foram lavadas com água corrente e etanol e secas nos respectivos microtubos, para cada tempo (1, 5, 30, 60 minutos). A seguir adicionou-se uma gota de poli-L-Lysine 0,1% (sigma P8920) em cada microtubo e promoveu-se a ressuspensão e aguardou-se a sedimentação por 5 minutos. Decorrido esse tempo as amostras foram incubadas com 1 gota do tetróxido de ósmio 2%, por 30 minutos. Seguiu-se lavagem cuidadosa com água destilada 2x seguida de sucessiva desidratação com acetona na seguinte sequência: 50% de acetona por 5 minutos, 70% de acetona por 5 minutos, 90% de acetona por 5 minutos e 100% de acetona por 5 minutos 2x. Concluída essa fase as amostras foram lavadas com CO₂ líquido 5x à 4 °C. Na fase seguinte, foi realizada secagem no ponto crítico com CO₂ 30 °C – 37 °C (aparelho Balzers CPD 030). As células, previamente fixadas, foram colocadas em lamínulas de vidro. Finalmente, procedeu-se a metalização das amostras com ouro por 2 minutos em suportes metálicos (stubs) visando a obtenção das imagens por MEV. O microscópio de varredura (Jeol 840A) foi utilizado para obtenção das imagens da morfologia dos neutrófilos nos tempos definidos, utilizando-se aceleração de voltagem de 20 kV.

4.6.2.1 Análise Elementar por Dispersão de Raio X

Amostras dos neutrófilos estimulados por NPs de TiO₂ foram recobertas com uma fina camada de ouro (Au) e submetidas a análise elementar semi-quantitativa de microrregiões, bem como análise de sua morfologia com obtenção de imagens com aparência tridimensional através do detector de espectroscopia por dispersão de raios-X (EDX) acoplado ao microscópio eletrônico de varredura (MEV) Jeol 840A, a uma voltagem de aceleração de 15 kV (Laboratório de Microscopia Eletrônica, Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília-DF). Os resultados foram determinados pela análise de duas células e uma área de cada célula em triplicata no tempo 30 minutos. A concentração atômica relativa foi calculada a partir da altura relativa dos picos, após a correção por fatores tabulados de sensibilidade.

4.6.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Após a hemólise os neutrófilos foram ressuspensos em 500 μL de *HBSS* (sem Ca^{2+} e Mg^{2+}). A seguir realizou-se a contagem para rendimento celular. Foram separadas 3×10^6 células para cada microtubo. Por questões de ajuste experimental à MET, foram selecionados os tempos de 5 e 60 minutos de incubação dos neutrófilos com NPs de TiO_2 e seus respectivos controles. Após a separação, as células foram fixadas com 100 μL de solução de *Karnovsky* (0,1 M) por 2 horas a 4°C (KARNOVSKY, 1965). Sucessivas lavagens com PBS foram realizadas, seguidas de centrifugações conforme o protocolo anterior para MEV. As células foram ressuspensas em 1 mL de PBS, e a seguir foram levadas para o processamento com MET.

O processamento para MET necessitou de sucessivos ajustes até conseguir-se o número de células ideal e a concentração da resina para inclusão das amostras. Para o processamento para MET, as amostras foram lavadas três vezes, por 15 minutos cada, em tampão cacodilato de sódio 0,1M (pH- 7,2-7,4), pós- fixadas em tetróxido de ósmio 1% (OsO_4), ferrocianeto de potássio a 1,25%, por duas horas no escuro e lavadas por 3 vezes com água destilada. Permaneceram em solução aquosa de acetato de uranila 5% por 12 a 14 horas no escuro e foram desidratadas em acetona (50%, 70%, 90%, e 100%) em banhos de 15 minutos cada, sendo que o banho de acetona 100% foi repetido quatro vezes. A infiltração foi realizada seguindo-se, em seqüência, as seguintes proporções de acetona e resina, respectivamente: (2:1), (1:1), (1:2) por seis horas cada, e finalmente resina pura. Em seguida as amostras celulares foram emblocadas diretamente nos microtubos com resina Spurr pura (*Electron Microscopy Science, EUA*) e polimerizadas a 60°C por dois dias. O excesso de resina polimerizada foi retirado para expor a amostra e permitir os cortes no ultramicrotomo. Os cortes ultrafinos da resina com as amostras (ultramicrotomo *Leica Ultracut R*) foram realizados com facas de vidro ou diamante e colocados em pequenas telas circulares de cobre para visualização no microscópio eletrônico de transmissão (*JEOL JEM – 1011 Electron Microscope*), do Laboratório de Microscopia Eletrônica, da Universidade de Brasília, a uma voltagem de aceleração de 15 kV. Concluída essa fase as imagens obtidas foram armazenadas para posterior análise.

**Os experimentos com microscopias (de Luz, MEV e MET) foram realizados em triplicata.*

4.7 Análise das propriedades nanomecânicas de neutrófilos por Espectroscopia de Força Atômica

Esse ensaio permitiu analisar algumas propriedades mecânicas relacionadas com os efeitos da exposição de neutrófilos humanos a NPs de TiO₂ por Espectroscopia de Força Atômica e as alterações consequentes a essa interação ao longo do tempo (1, 5 e 30 min). Parâmetros como *snap in*, força de carga máxima (*maximum load Force*), força de separação (*detachment force*), módulo de *Young* (elasticidade), e energia dissipada (*dissipated energy*) foram analisados em nanodomínios de células aderidas em lamínulas, por uma ponteira não-funcionalizada na direção Z. As características como rigidez e o comportamento da elasticidade foram investigados.

Um equipamento comercial de microscopia de força atômica (*SPM-9600, Shimadzu, Japão*) foi utilizado para analisar as forças de interação da superfície entre os átomos de uma ponteira e das membranas celulares, operado em modo de contacto de ar. Lâminulas circulares (10 mm) contendo neutrófilos aderidos de cada amostra foram fixadas em um suporte metálico com fita adesiva dupla face. Uma ponta de nitreto de silício piramidal (raio de curvatura <20 nm) integrada a um cantilever com 200 µm de comprimento (constante de mola 0.15 N/m e aproximadamente 24 kHz de frequência de ressonância) foi utilizada nessa técnica. a taxa de aquisição foi de 1 Hz e 20 V de amplitude e 3 V de ponto de operação. Para cada tempo de incubação (1, 5 e 30 min) 10 células de cada condição (controle e TiO₂) foi analisada e 5 curvas de força por célula foram medidas resultando em 300 eventos.

O programa *SPIP* v. 5.1.5 foi utilizado para análise de curva de força, configurado em 23 °C e constante de mola 0.15 N/m, cone de indentação (*Sneddon*), 5 pontos de ajuste e curva de aproximação como curva de correção de referência. Os dados de espectroscopia de força foram analisados utilizando o *software Origin 8.6* por ANOVA e teste de *Tukey* (P <0,05).

4.8 Lise Celular e Extração Protéica

As amostras de neutrófilos quiescentes e da condição 30 minutos (TiO_2) de incubação, sofreram lise das membranas externas e internas (organelas), com detergentes, degradação dos ácidos nucleicos, desnaturação, solubilização, redução das proteínas e inibição das proteases.

Para tanto, 2×10^7 células em *HBSS* foram preparadas, incubadas nas respectivas condições e em seguida procedeu-se à centrifugação das amostras, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados ao *pellet*, 450 μL de tampão de lise (uréia 7M, tiouréia 2M, triton X-100 1%, *Pharmalyte* pH 4-7 0,5%, inibidores de protease (*GE Healthcare*) 1% e nuclease (*GE Healthcare*) 1%. As amostras foram submetidas a agitação com vórtex por cinco minutos e em seguida deixadas sob incubação com agitação leve durante 1 hora em temperatura ambiente. Após esse tempo foram acrescentados 50 μL de DTT 0,1mg/ μL e 3 μL de *EDTA* 0,16 M a cada amostra seguido de agitação no vórtex durante 5 minutos, incubando-se por mais uma hora conforme descrição anterior. O *EDTA* e o *DTT* foram utilizados após 1 hora para não inibir a ação da nuclease (*EDTA*) e nem interferir na ação da tiouréia (*DTT*), (BERKELMAN; STENSTEDT, 2001).

*As amostras da lise celular e do extrato protéico foram analisadas em triplicata técnica para cada indivíduo

*O tampão de lise é uma solução usada para promover lise celular e o rompimento de organelas, além de solubilizar grande parte das proteínas. Os inibidores de protease também são importantes para se evitar a degradação de proteínas por proteases após o início da lise. O pré-tratamento das amostras com tampão de lise envolve também o rompimento de agregados protéicos promovidos por lipídios de membrana pouco solúveis, a desnaturação protéica e a quebra de interações moleculares entre as proteínas (HERBERT, 1999; SANTOS, 2007).

4.9 Dosagem das Proteínas das Amostras

Com a lise dos neutrófilos de cada uma das amostras (quiescente e TiO_2 30 minutos, a solução obtida foi centrifugada e a seguir realizada a dosagem de proteínas totais do sobrenadante, com base no método descrito por Bradford (1976) e adaptado por Ramagli (1985) para compatibilidade com o tampão de solubilização utilizado (BRADFORD, 1976 ; RAMAGLI; RODRIGUEZ, 1985). Foi feita uma curva

de calibração com albumina bovina, cujo coeficiente R aceitável era acima de 0,99. Cada amostra foi dosada em triplicata determinando assim, a concentração de proteína. O volume foi calculado para obtermos 50 µg de proteína e adicionamos a esse volume, tampão de lise (uréia 7M, tiouréia 2M, *pharmalyte pH 4-7* 0,5%, *triton X-100* 1%, inibidores de protease 1% e nuclease 1%) até completar o volume de 350 µL.

4.10 Focalização Isoelétrica (IEF ou 1a Dimensão):

Para viabilidade técnica foram focalizados os strips das amostras dos grupos quiescente e 30 minutos de um mesmo indivíduo. Esse procedimento foi realizado em duplicata para cada indivíduo. Alíquotas com 50 µg de proteínas em 350 µL de tampão de lise foram aplicadas num sarcófago (canaleta de cerâmica contendo pólos positivo e negativo), seguindo-se à sobreposição de gel em forma de strip, com 18 cm de comprimento, 0,3 cm de largura, e intervalo de pH de 4 a 7 (*Immobiline DryStrip, Amersham Biosciences, UK*). Sobre essa disposição foram colocados 400 µL de óleo mineral (*PlusOne®*), para se evitar o ressecamento do strip durante o processo.

Em seguida, os sarcófagos foram submetidos à IEF no instrumento *IPG-Phor II (Amersham Biosciences, UK)*. As amostras passaram por uma etapa de reidratação de 12 horas e a seguir iniciaram-se as etapas de focalização: uma, em gradiente crescente até 500 V por 500 Vh; outra, em gradiente crescente até 3500 V por 3500 Vh, e a última, constante de 8000 V por 40000 Vh. A temperatura de hidratação e a focalização das amostras foi mantida a 20°C, e a corrente limite a que ficaram submetidas foi de 75 µA por strip. As amostras controle e TiO₂ de um mesmo indivíduo foram focalizadas simultaneamente.

4.11 Etapa de Equilíbrio

Com o término da etapa da focalização isoeletrica, os strips foram retirados do IPG-Phor II e imersos em 5 mL de solução de equilíbrio composta de uréia 6M, SDS 10%, glicerol, TRIS HCl 1,5 M pH 8,8, com DDT 1%, agente redutor de pontes dissulfeto, onde permaneceram por 15 minutos, sob agitação leve, em temperatura ambiente. Após o tempo de redução, os *strips* foram imersos em uma solução de equilíbrio contendo além dos componentes mencionados anteriormente (exceto

DTT), Iodoacetamida 135 mM, com o objetivo de alquilar os grupos -SH reduzidos, também por 15 minutos, no escuro.

*Alquila ou alcoila- é um radical orgânico monovalente de fórmula geral $(C_nH_{2n+1})-$, formado pela remoção de um átomo de hidrogênio de um hidrocarboneto saturado.

4.12 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

Amostras de proteínas de neutrófilos de cinco indivíduos foram preparadas em duplicata para obtenção de vinte géis (5 replicatas biológicas e 2 experimentais, divididas em 10 géis normais e 10 géis de extratos protéicos de neutrófilos incubados com TiO_2 por 30 minutos). Os géis de poliacrilamida 12% foram preparados entre duas placas de vidro, utilizando o sistema *Protean II* (*BioRad, Hercules, CA, USA*) para todos os géis de 2ª dimensão. O gel separador foi feito em um volume de 40 mL para cada gel, e composto de 13,2 mL de água *Milli-Q*, 40% de acrilamida/bisacrilamida (*PlusOne®*), 25% de Tris 1,5M *pH* 8.8 (*PlusOne*), 1% de *SDS* 10%, 1% de *PSA* (Persulfato de Amônio) 10% (*Sigma*) e 0,04% de *TEMED* (*N,N,N,N tetramethyl enediamine, Sigma*). O concentrador foi preparado em um volume de 5 mL e polimerizado sobre o separador entre as placas de vidro, junto com o pente que irá formar o poço do marcador de massa molecular e o poço para afixar o strip da 1ª dimensão. O concentrador é constituído de 2,8 mL de água *Milli-Q*, 12,6% de Acrilamida/Bisacrilamida, 25% de *Tris* 0,5M *pH* 6.8, 1% de *SDS* 10%, 5% de *PSA* 10% e 0,08% de *TEMED*.

O marcador de massa molecular (*Amersham Pharmacia- Biotech*) é uma mistura de proteínas de massas moleculares conhecidas, tais como: fosforilase b (94000 Da), 48 albumina (67000 Da), ovoalbumina (43000 Da), anidrase carbônica (30000 Da), inibidor de tripsina (20100 Da), e lactoalbumina (14400 Da), adicionado a um poço ao lado do strip, na segunda dimensão, para permitir uma estimativa da massa molecular das proteínas separadas no gel. Após o tempo de equilíbrio, cada strip foi colocado em um poço adaptado para encaixá-lo e coberto com agarose morna 0,3%, misturada ao azul de bromofenol, com objetivo de fixar o strip no gel de poliacrilamida, após seu resfriamento. Em seguida, o gel foi transferido para uma cuba contendo 2 L de tampão de corrida *Tris* base 0,55 mol/L - Glicina 1,92mol/L *pH* 8,3 para ser submetido à diferença de potencial, permitindo a migração das

proteínas. Adaptou-se o gel a uma cuba superior que foi totalmente preenchida com 500 mL do mesmo tampão de corrida, fechando sua tampa e a conectando à fonte elétrica. Essa estrutura também foi acoplada a um aparelho de refrigeração a base de água (*Multitemp II Cooling Bath, Amersham Biosciences*), que manteve toda a montagem a uma temperatura constante de 15°C. A corrida foi realizada com amperagem constante de 20 mA e a voltagem de 500 V. O azul de bromofenol foi utilizado como agente visualizador da altura de corrida, durante a eletroforese.

4.13 Coloração dos Géis

Os géis obtidos foram corados pelo método prata de alta sensibilidade. Nesse método, a sensibilidade torna-se aumentada pela mistura de nitrato de prata com amônia, em pH básico (LARSEN et al., 2001; SHEVCHENKO, 1996).

Após o término da separação eletroforética os géis foram mergulhados na solução de fixação (12% de ácido tricloroacético e 50% de metanol), permanecendo em agitação leve por uma hora. Em seguida os géis foram imersos em outra solução fixadora (5% ácido acético e 50% etanol) também por uma hora em agitação leve. Os géis foram lavados duas vezes em água *Milli-Q* por cinco minutos cada, adicionou-se a seguir a solução de impregnação de prata contendo: 0,89% de AgNO_3 , 0,3% de NH_4OH e 0,08% de NaOH . O gel permaneceu nessa solução por 20 minutos e realizou-se uma nova lavagem com água *Milli-Q* por cinco minutos. Na etapa de revelação dos géis utilizou-se 0,017% de ácido cítrico e 0,236% de formaldeído. Após a visualização completa dos spots, o gel foi imediatamente imerso na solução de parada da reação contendo: 30% de etanol, 7% de ácido acético e 2,5% de glicerol 87%, onde permaneceu por 20 minutos. Finalmente os géis foram imersos por 1 hora na solução de lavagem e hidratação (30% de etanol 95% e 2,5% de glicerol 87%).

4.14 Digitalização e Secagem dos Géis

Cada gel teve sua imagem digitalizada e armazenada em computador, por meio de *scanner* modelo *Image Scan UMAX GE®-USA*, com uma resolução de 300 *dpi* e alta nitidez. Foram armazenadas, para todos os géis, imagens coloridas nos formatos JPG e PSD, e imagens em 256 tons de cinza no formato *TIFF* (2124 x 2087 pixels). Após ser digitalizado, cada gel foi colocado entre 2 folhas de celofane

hidratadas em solução de 32% de etanol e 1% de glicerol 87% sobre uma placa de vidro lisa. Os géis foram então armazenados na câmara fria até secar; já secos foram cortadas as bordas das folhas de celofane e os géis guardados.

4.15 Análise Computacional das Imagens dos Géis

As imagens dos géis da condição Normal e da condição TiO_2 (neutrófilos + TiO_2 , 30 minutos) foram analisadas com o auxílio do *software Image Master 2D Platinum* versão 5.0 e versão 6.0 (GE Healthcare). A versão 5.0 do software têm parâmetros com melhor resolução automática para *smooth*, que possibilita discriminar ruído de *spot* e definir *spots* em sobreposição; *saliency*, que define a curvatura de um *spot*, também ajudando a retirar ruídos e *min area*, que elimina artefatos próximos aos *spots* que não foi eliminado com a *saliency* e nem o *smooth*. Foram feitas as detecções automáticas, isto é, delimitações dos *spots*, segundo parâmetros descritos acima com valores preestabelecidos para cada gel, tais como, cobertura na delimitação de um maior número de *spots*, exclusão de *background* e melhor separação de *spots* próximos. Porém, os géis passaram por revisões de detecção feitas manualmente com ajuda dos recursos de visualização de *spots* em 3D, mudança de contrastes e/ou de cores e gráficos marcando a intensidade tanto na lateral quanto na parte superior, indicando onde um *spot* começa e termina. As revisões foram feitas para adicionar *spots* não detectados, separar e juntar *spots* e excluir *background* e artefatos da coloração detectados erroneamente.

Após essa criteriosa revisão as imagens foram transferidas para o *software Image Master 2D Platinum versão 6.0*, onde foi processado o pareamento dos *spots* entre os géis, com análises da variação da porcentagem do volume intra e intergrups.

Primeiramente selecionaram-se os *Landmarks* (pares de *spots* marcadores entre géis diferentes), e processou-se o pareamento automático. O pareamento também passou por revisões manuais criteriosas.

Os géis foram pareados da seguinte forma:

1- Quiescentes (controles): onde foi selecionado um gel quiescente HQ1 como referência, por ser o gel com maior número de *spots* e mais bem focalizado. Esse gel referência foi pareado com a duplicata de todos os géis normais,

2- Estimulados com TiO_2 : o gel TiO_2 1A referência pareado com a duplicata de todos os géis TiO_2 ,

3-Pareamento dos géis referências: Quiescentes e TiO₂. (Figura 13).

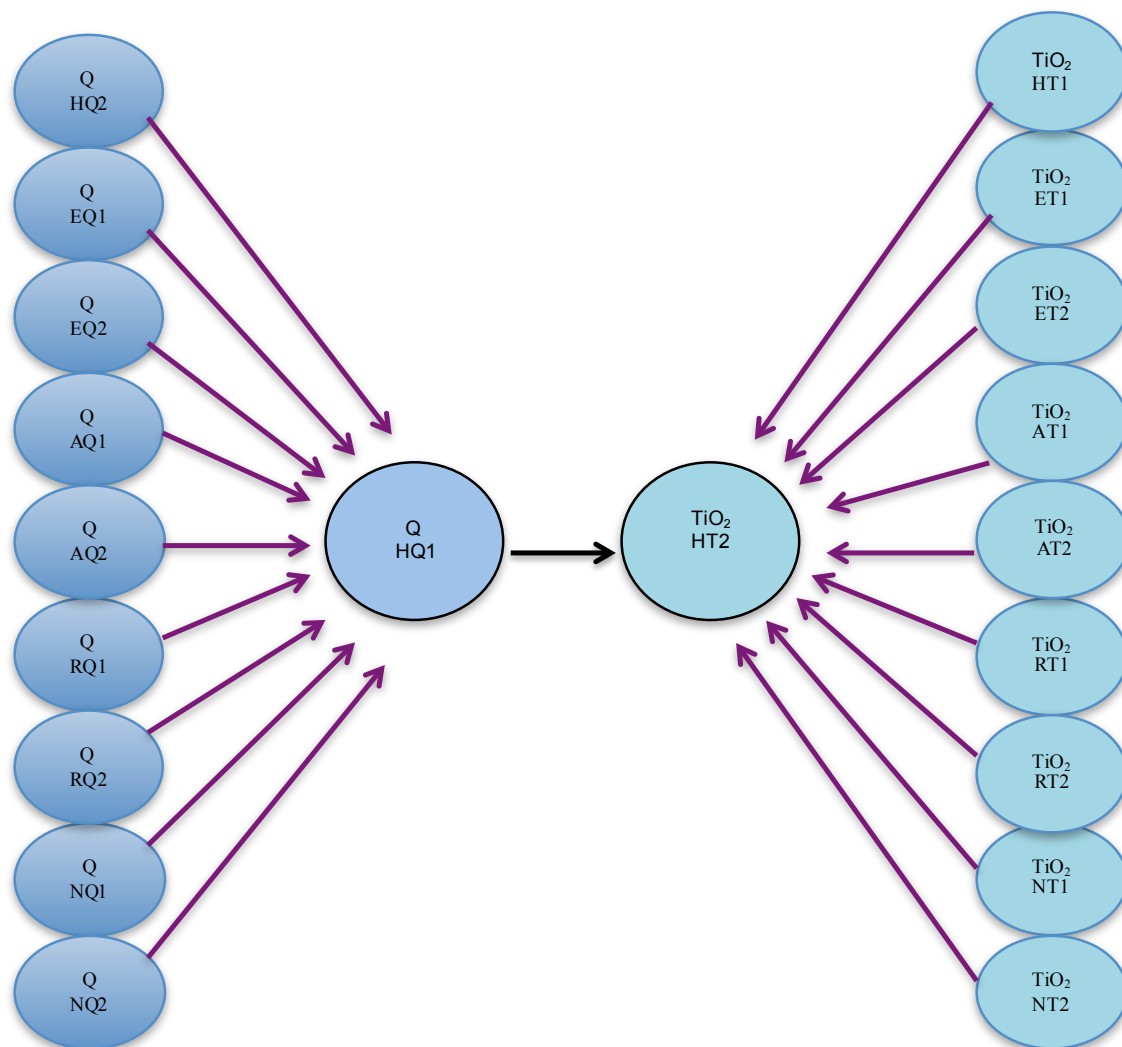


Figura 13- Esquema geral do pareamento. Cada círculo representa um gel, divididos em duplicatas para cada indivíduo. Primeira etapa do pareamento (setas vinho) e a segunda etapa do pareamento (seta preta). Q (Quiescente) e TiO₂ (dióxido de titânio). HQ1-Gel quiescente *Master* número 1 do indivíduo H, HT2- Gel titânio *Master* número 2 do indivíduo H.

A seguir foi feita a revisão do pareamento com auxílio de ferramentas como: sobreposição das imagens dos géis pareados com diferentes cores; análise das vizinhanças dos *spots*; vetores que permitem visualizar a orientação dos pareamentos; *scatter plot* (gráfico de correlação dos *spots* entres os géis pareados). Foram obtidas tabelas com a normalização de cada spot pareado (porcentagens do volume), tanto intraclasses: classe quiescentes e classe TiO₂, como interclasses:

classe quiescente e classe TiO₂ comparados entre si. Esses dados foram submetidos à análise estatística. Para a determinação da quantidade relativa de cada *spot* foi usado o método de normalização do volume. Neste método o volume de cada *spot* foi dividido pelo volume total de todos os *spots* no gel e multiplicado por um fator constante de valor 100, que produz uma *spots* no gel e multiplicado por um fator constante de valor 100, que produz uma porcentagem de volume de cada *spot*.

4.15.1 Análise Estatística

Os valores de porcentagem de volume dos spots nos 10 géis do grupo Quiescentes e nos 10 géis do grupo TiO₂ foram utilizados para a análise estatística no programa SPSS® Base 13.0.

Para verificar se a distribuição dos dados poderia ser considerada gaussiana, levaram-se em conta os critérios de média das porcentagens de volume, mediana, simetria da curva de distribuição e proporção altura *versus* largura da curva além do teste de *Kolmogorov-Smirnov*.

O teste t pareado foi utilizado para as comparações de médias dos *spots* cujos valores apresentaram distribuição normal e o teste de Wilcoxon foi empregado para as comparações dos spots com valores de distribuição não paramétrica. O nível de significância $p < 0,05$ foi considerado para os dois testes.

Outro critério adotado como limitante para a consideração da abundância diferencial foi a variação das médias da porcentagem do volume, sendo considerados os spots que variaram em no máximo de $\frac{1}{2}$ valor para abundância diminuída e no mínimo de 2 vezes para abundância aumentada, entre as condições. Ainda como critério de inclusão dos spots como diferencialmente expressos, foi verificado se os *spots* estavam presentes em pelo menos 8 géis de cada condição (BIRON, 2006).

Triplicatas experimentais e biológicas de uma condição foram utilizadas como estudo piloto e foi utilizado o valor da porcentagem de volume de cada *spot* fornecidos pelo programa *Image Master* para calcular quantas replicatas experimentais e biológicas seriam necessárias, segundo o modelo de análise de potência descrito por Cairns, (2011). Os cálculos foram realizados utilizando o programa estatístico *R* e foi observada a média da variação experimental de 0,08 e a média da variação biológica de 0,9, o que demonstra uma variação nas replicatas

biológicas maior que nas técnicas, confirmando a reprodutibilidade técnica dos ensaios. Assim, para se obter um $\alpha=0,05$ e $\beta=0,8$, e considerando-se a diferença de volumes entre os *spots* de no mínimo 2 vezes, as duplicatas experimentais mostraram-se adequadas quando o número de replicatas biológicas foi de 5 indivíduos. Além disso, o *spot* só foi considerado quando estava presente em pelo menos 8 dos 10 géis.

4.16 Digestão de spots protéicos

Os spots selecionados de gel de neutrófilo não ativado e dos ativados por TiO_2 , após análise de imagens e estatística foram recortados em cubos pequenos, e transferidos para microtubos de 0,5mL, para a digestão trípica. Adicionou-se a cada microtubo 50 μL de acetonitrila 50% alternados três ciclos de lavagens com água *Milli-Q*, com vórtex entre as trocas. Após o sobrenadante foi retirado e acrescentou-se solução descorante composta de ferricianeto de potássio 15 mM (agente oxidante para remoção da prata) e tiosulfato de sódio 50 mM (dissolve haletos de prata) solubilizados em 1 mL de água *Milli-Q* por aproximadamente 10 min. Após os *spots* foram lavados com 200 μL água em *vortex*, até o gel ficar transparente límpido. Em seguida foram realizados três ciclos alternados de embebição com 50 μL de bicarbonato de amônia (NH_4HCO_3) 50 mmol/L (composto volátil com pH 8 ótimo para atuação da tripsina, retira o SDS) e 50 μL de acetonitrila 100 % (desidrata o *spot*, retira resíduos de SDS). O *spot* foi macerado na última lavagem com 60 μL de acetonitrila, composto esse que facilita o processo pelo aumento da área de superfície do spot. Depois de macerado, o *spot* no microtubo, foi para a centrífuga a vácuo por aproximadamente 20 min (*SpeedVac*), para que a amostra ficasse totalmente seca. Após esse período o gel foi hidratado com 10 μL de solução gelada de tripsina (para um volume final de 50 μL são utilizados: 25 μL de bicarbonato de amônia 25 mM, 1,25 μL de cloreto de cálcio 5 mM, 3,125 μL de tripsina 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e 20,625 μL de água *Milli-Q*) durante 45 min no gelo. Após esse tempo, foram adicionados aproximadamente 10 μL do tampão de digestão (para volume final de 50 μL são necessários: 25 μL de bicarbonato de amônia 50 mM, 1,25 μL de cloreto de cálcio 200 mM e 23,75 μL de água *Milli-Q*), quantidade suficiente que possa cobrir o gel, sendo incubado a 37° C (temperatura ideal para atuação da tripsina)

overnight entre 12 e 18 h (CASTRO et al, 2006).

Transcorrido o tempo para digestão dos spots iniciou-se a extração dos peptídeos. Foram preparadas uma solução estoque e uma solução matriz, para uso imediato. A solução estoque compreende duas matrizes utilizadas para aumentar a sensibilidade do processo de ancoramento dos peptídeos hidrofílicos (*DHB*) e hidrofóbicos (*HCCA*) na placa *AnchorChip*. Para o *DHB* (2,5 Dihydroxybenzoic acid – *Fluka Analytical*) foram pesados 20 mg/mL e misturados em 90 % de acetonitrila e 10 % de ácido trifluoroacético 0,1 %, enquanto que o *HCCA* (ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico – *Bruker Daltonics*) também foi pesado 20 mg/mL e misturado em 90 % de acetonitrila e 10 % de ácido trifluoroacético 5 %. A solução matriz foi feita a partir dessa solução estoque na proporção de 5 partes de *DHB* do estoque para 15 partes de 90 % de acetonitrila e 10 % de ácido trifluoroacético 0,1 %. A mesma proporção foi feita para a matriz *HCCA*, onde se tem 90 % de acetonitrila e 10 % de ácido trifluoroacético 5 %. As duas matrizes foram unidas na proporção de 1:1 com concentração final de 5 µg/mL.

O preparo das ponteiros *Gel Loader* e da microcoluna cromatográfica com fase estacionária poros R2 (*Applied Biosystems*) seguiu-se ao preparo das matrizes. As ponteiros tiveram suas pontas amassadas o suficiente para que 10 µL de água *Milli-Q* gotejassem lentamente. Após esse processo foram colocados 10 µL de acetonitrila 100 % na ponteira, seguido de 1 µL da solução com resina R2 (5 mg da resina R2 em 500 µL de isopropanol 100 % ou acetonitrila 100 %). Foi acoplada à ponteira, até então com a resina e *TFA* 100 %, uma seringa que injetou rapidamente a resina ao longo da ponteira de tal forma que se formou uma coluna de aproximadamente 2 cm. Durante esse processo a resina compactada na ponta da ponteira permaneceu imersa em alguma solução para que não ocorresse o ressecamento da mesma (THINGHOLM et al., 2006). Preparadas as matrizes e a ponteira *Gel Loader* com R2, a amostra que ficou *overnight* foi retirada da incubação a 37 °C e centrifugada por 1 minuto á 30 g. Foi acrescentado 1 µL de *TFA* 1% e novamente centrifugado. Antes da amostra ter sido colocada na placa de *AnchorChip*, foram passados 10 µL de *TFA* 1 % pela coluna poros R2 seguido de 20 µL de *TFA* 0,1 %. A seguir a amostra passou pela resina lentamente, seguida de 20 µL de *TFA* 0,1 %. A mistura de matrizes (2 µL) permitiu a retirada da amostra

aderida na resina, formando uma pequena gota, que ao ser encostada na superfície da placa aderiu na superfície do poço. Depois de secas as amostras foram submetidas a espectrometria de massa.

4.17 Espectrometria de massa (MALDI-TOF)

Os espectros de massas das amostras foram obtidos em um espectrômetro de massa tipo *MALDI-TOF-TOF*, modelo *Autoflex II*[®] (*Bruker Daltonics, Bremen, Germany*), em modo positivo e refletor, (fonte de íons 1 = 20 KV) com faixa de massa de 800 a 3000 (m/z) após calibração externa utilizando uma mistura padrão de peptídeos, *pepmix*. Os espectros obtidos foram calibrados internamente com picos originários da digestão de queratina e tripsina e editados manualmente com a seleção de picos monocarregados e característicos de distribuição isotópica. A edição foi realizada usando os programas *Flexanalysis* e *Biotoools*.

4.18 Buscas em bancos de dados

As buscas em bancos de dados foram realizadas através do programa *MASCOT* (www.matrixscience.com), usando o banco de dados não redundante do NCBI, National Center for Biotechnology Information. Os parâmetros de busca foram: tolerância de desvio de massa molecular entre 50 e 200 ppm, espécie *Homo sapiens*, máximo de uma clivagem tríptica perdida, carbamidometilação como modificação constante de cisteínas e oxidação de metionina como modificação variável. Os espectros obtidos de acordo com os parâmetros de busca selecionados para proteínas de neutrófilos, foram validados pelos seguintes critérios:

1. Similaridade da massa e *pI* teórica e experimental: ao comparar massa e *pI* dos resultados obtidos a partir do pareamento das massas provenientes da digestão tríptica e a obtida no gel bidimensional, observamos uma proximidade dos valores, provavelmente pelas variações do gel bidimensional,
2. Porcentagem de cobertura da sequência da proteína: está relacionado com a quantidade de peptídeos experimentais pareados em relação a uma proteína teórica, configurado pela porcentagem cobertura da proteína, calculado pelo programa *Mascot*.

3. *Score* – PMF: o *software Mascot* realiza uma primeira pesquisa que compara as massas dos peptídeos calculados para cada entrada no banco de dados com um conjunto de dados experimentais, chamado *Mowse*. Cada valor calculado que cai dentro de uma tolerância determinada de massa e um valor experimental é considerado como um *match*.

4. Número de clivagens perdidas: avaliação realizada de forma manual, observando os dados fornecidos pelo *Mascot*, como, a) perda de clivagem coerente, b) confirmação de clivagens perdidas

5- Confirmação da oxidação e acetilação:

Com base nos peptídeos identificados, podemos observar uma sequência oxidada e acetilada , mostrada pelo *Mascot* e confirmadas com o aparecimento da mesma sequência sem a oxidação e outra sem acetilação. A presença de ambas as formas (modificada e não modificada) valida a identificação.(NEVES, 2010)

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Separação de células e exposição ao titânio

Após a adequação dos procedimentos às particularidades do presente estudo foi possível obter neutrófilos com nível de pureza superior a 97% e viabilidade superior a 98% verificados por microscopia óptica. As separações obedeceram ao protocolo de gradientes de *PERCOLL*^R diluído em *HBSS* nas porcentagens de 70% e 60%, sendo a alta pureza (97%) avaliada pela contagem diferencial, tendo como principal contaminante os eosinófilos, cujo tamanho, granularidade e densidade são próximos ao dos neutrófilos. Em relação ao volume de células de PMNs nosso grupo já havia demonstrado média entre $1,5 - 2 \times 10^6$ neutrófilos por 3mL de sangue, variável para cada indivíduo (AQUINO, 2008). No presente estudo, resultados similares foram obtidos em separações com tubos Falcon cônicos de 15 mL (2×10^6 / 3mL de sangue total). Entretanto, a utilização de um protocolo com um volume de sangue maior (24 mL) com gradientes de 60 e 70% montados em 2 tubos Falcon de 50 mL com 12 mL de sangue total para cada tubo (conforme gradientes da tabela II) permitiu a obtenção de quantidade de células em torno de $1,7 - 5 \times 10^7$ PMNs.

A metodologia de exposição às nanopartículas de titânio foi ajustada em vários ensaios e diversos tempos de exposição foram testados, de forma que os tempos adotados representam tempos de exposição referidos na literatura e com boa recuperação de células viáveis (GONÇALVES et al, 2010, GONÇALVES; GIRARD, 2011).

5.2 Teste de viabilidade celular com nigrosina- a frequência de neutrófilos vivos foi alterada após exposição às NPs de TiO₂, ao longo do tempo.

Os resultados do teste de viabilidade celular utilizando o corante Nigrosina e análise de células ao microscópio de luz revelaram que a interação celular com partículas de TiO₂ na concentração de 200 µg/mL alterou a frequência de células vivas, em função do tempo de exposição (Figura 14).

Houve efeito significativo do fator Grupo ($F_{1, 4}=400,0$, $p<0,001$). A viabilidade média do grupo controle ($98,3\pm 0,2$) foi superior à média do grupo Titânio ($93,3\pm 0,2$), ($p<0,001$), ou seja, sem considerar o tempo, a viabilidade do grupo controle foi maior. Houve efeito do fator tempo ($F_{3, 12}=20,163$, $p=0,005$). Isto é, sem considerar o

Grupo da amostra, há diferenças entre os tempos de medição. O procedimento de comparações múltiplas (Bonferroni) mostrou que a média do minuto 1 ($98,3 \pm 0,3$) foi superior às médias dos minutos 30 ($94,8 \pm 0,3$; $p=0,022$) e 60 ($92,5 \pm 0,7$; $p=0,021$) e não foi estatisticamente diferente da média do minuto 5 ($97,3 \pm 0,6$; $p=0,868$). A média do minuto 30 foi significativamente superior à média do minuto 60 ($p=0,047$). Finalmente, houve também efeito estatisticamente significativo da interação entre os fatores Grupo e Tempo ($F_{3, 12}=13,878$, $p=0,012$). A análise *pos hoc* utilizando testes-t de Student dentro de cada tempo mostrou que existem diferenças significativas entre os grupos só nos tempos de medição 30' ($p<0,001$) e 60' ($p=0,003$).

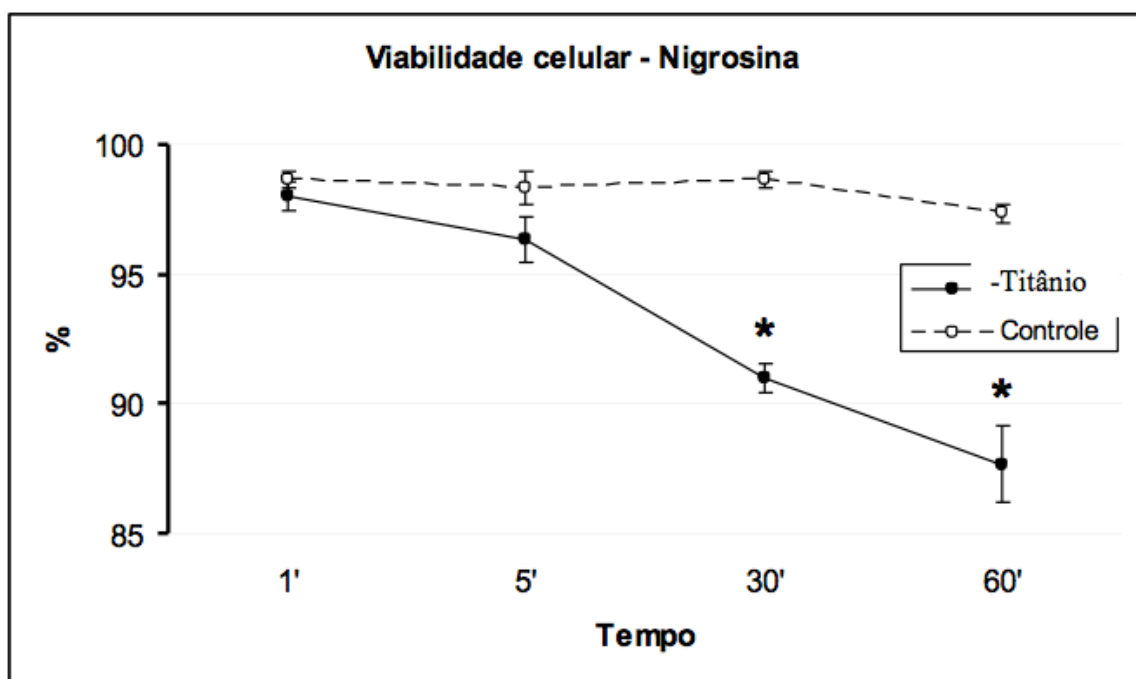


Figura 14. Média \pm erro padrão da viabilidade celular em cada tempo de medição para cada grupo (1, 5, 30 e 60 minutos). *: Titânio < Controle, $p<0,005$. Houve Diferença estatisticamente significativa nos tempos 30 e 60 minutos por efeito do tratamento das células com as NPs de TiO_2 (200 $\mu\text{g/mL}$) em relação aos controles.

Hussain et al, 2010 demonstrou que em 30 minutos de exposição de células da linhagem epitelial brônquica humana (16HBE14o) e células brônquicas primárias humanas a NPs de TiO_2 (15 nm) houve produção de ERO, peroxidação de lipídios e desestabilização das membranas de lisossomos, liberação de catepsina B. A

ativação de caspase-8 e caspase-3/7 ocorreu respectivamente após 1 e 2 horas resultando em fragmentação de ADN e apoptose após 4 horas de interação com as NPs do metal (HUSSAIN et al., 2010). Por outro lado Gonçalves et al., 2011 demonstraram que as NPs de TiO₂ (50-100 µg/mL) tiveram um efeito antiapoptótico sobre neutrófilos incubados, após 24 horas (GONÇALVES et al., 2010). Da mesma forma Hedenborg (1988) utilizando uma concentração de 200 µg/mL não observou apoptose dos neutrófilos (HEDENBORG, 1988). Nesse estudo observou-se que a viabilidade celular teve uma diferença estatisticamente significativa em relação aos controles a partir do tempo 30 minutos de exposição as NPs de TiO₂. Esse resultado demonstra um efeito significativo na diminuição da frequência de células vivas das NPs de TiO₂ nos neutrófilos na concentração de 200 µg/mL em comparação com os controles, mantendo uma taxa em torno de 85 % de neutrófilos viáveis no tempo 60 minutos. Essa redução (máximo de 13%) na taxa de células viáveis indica a necessidade de análise da interação dos neutrófilos com as NPs de TiO₂ em tempos de exposição maiores, para se verificar a tendência de aumento das taxas de apoptose na mesma concentração utilizada.

5.3 Morfologia dos neutrófilos

5.3.1 Neutrófilos tratados com NPs de TiO₂ alteraram sua morfologia ao longo do tempo.

A figura 15 mostra imagens de microscopia de luz comparando neutrófilos não expostos a NPs de TiO₂ (A, B, C, D) e neutrófilos expostos a NPs de TiO₂ (E, F, G, H) após 1 minuto (A e E), 5 minutos (B e F), 30 minutos (C e G), 60 minutos (D e H), respectivamente. Os neutrófilos quiescentes e aqueles incubados com TiO₂ na concentração de 200µg/mL foram corados com solução de Wright e analisados por microscopia de luz.

As células não tratadas mantiveram uma uniformidade da morfologia esférica celular ao longo do tempo. Por outro lado, os neutrófilos tratados por NPs de TiO₂ demonstraram alterações na morfologia celular de forma tempo dependente (1, 5, 30 e 60 minutos). Nesse grupo, o tempo 1 minuto mostrou morfologia semelhante à dos controles, com formato esférico e muitas células apresentavam NPs de TiO₂ na superfície da membrana plasmática (Figura 15-E). Essa rápida interação, após

contato com a membrana celular, também foi relatada por Herant et al., (2005) com esferas recobertas por imunoglobulinas e soroalbumina. As esferas com raios maiores que 3 μm rapidamente foram fagocitadas pelos PMNs após contato e adesão. Guduru (2011) correlacionou a interação de NPs carregadas positivamente na membrana celular com a formação de nanoporos, rompimento da membrana e deficiência da comunicação celular pela adesão na superfície (GUDURU, 2011; KIRCHNER et al., 2005). Entretanto, alterações na morfologia celular foram observadas já no tempo 5 minutos e tornaram-se marcantes nos tempos 30 e 60 minutos. Foi possível visualizar por microscopia de luz os aglomerados/agregados de NPs de TiO_2 nas células (Figura 15- F, G, H).

As células tratadas e as não tratadas apresentaram núcleo azul/róseo escuro seguindo o contorno da célula com 3 a 5 lóbulos. O citoplasma tinha coloração rosa pálido com granulações que variaram do rosa ao azul claro, sendo mais intenso nas células tratadas com NPs de TiO_2 . Esporadicamente, nos tempos 30 e 60 minutos encontrou-se algumas células que apresentavam imagens de inúmeros aglomerados de NPs relacionadas a picnose e redução do volume celular (Figura 15- G). Não foram observadas imagens de cariólise (que consiste na perda de coloração nuclear em decorrência da extensa fragmentação cromatínica) ou de cariorrexe (perda dos limites nucleares, com esporádicas aglomerações de cromatina na membrana nuclear) nos tempos analisados.

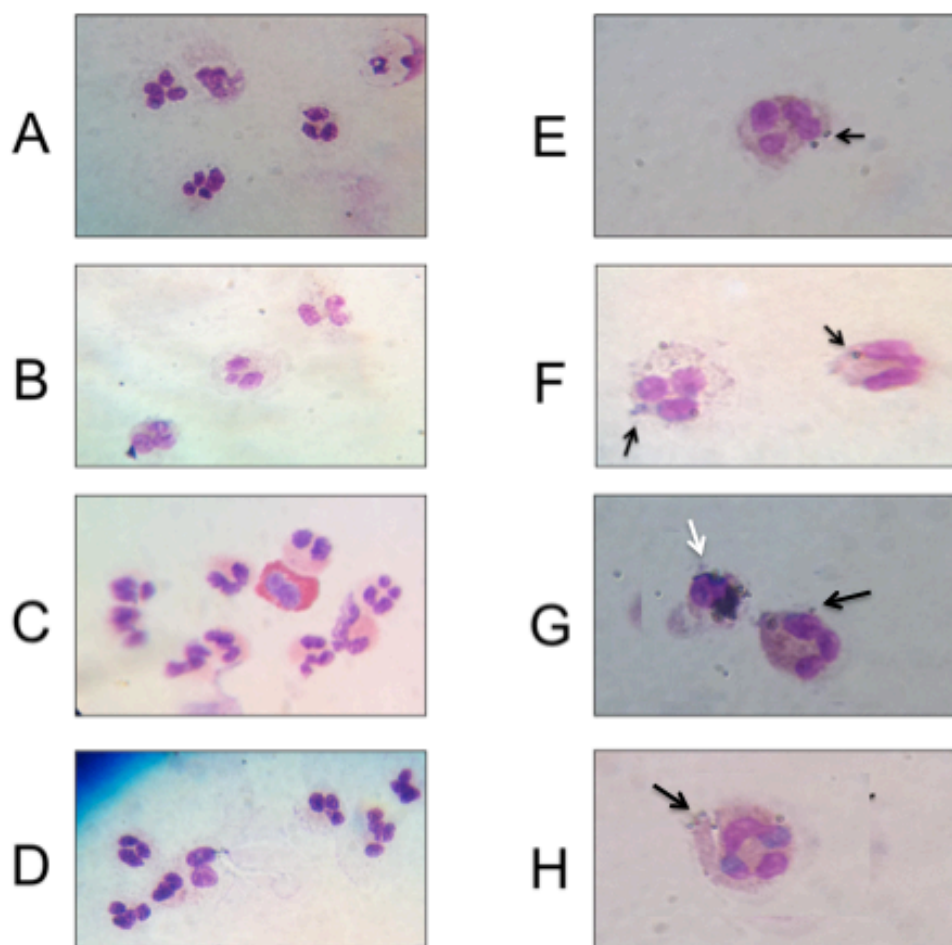


Figura 15- Imagens da morfologia dos neutrófilos nos tempos 1, 5, 30 e 60 minutos, nos controles (A, B, C e D) e após exposição a NPs de TiO_2 (E, F, G e H), analisados por microscopia de luz e coloração de Wright. As alterações da morfologia celular são marcantes nos tempos 5, 30 e 60 minutos (F, G e H). Algumas células apresentavam grandes aglomerados de NPs de TiO_2 com picnose e redução do volume celular (G- seta branca). As imagens das interações dos aglomerados/agregados de NPs de TiO_2 puderam ser vistos nos tempos 1, 5, 30 e 60 minutos (E, F, G e H- setas pretas)

5.3.2 Neutrófilos alteraram sua morfologia, apresentaram extensões tubulovesiculares, vesículas e poros na membrana após interação com NPs de TiO₂, ao longo do tempo.

A figura 16 mostra imagens de MEV comparando neutrófilos não expostos a TiO₂ (A, B, C e D) e neutrófilos expostos a NPs de TiO₂ (E, F, G e H). Após 1 minuto (A e E), 5 minutos (B e F), 30 minutos (C e G) e 60 minutos (D e H), respectivamente.

Os neutrófilos do grupo controle apresentaram um aspecto esférico ao longo dos tempos analisados e a presença de microvilosidades foi uma característica marcante da superfície celular nos tempos analisados nesse grupo (Figura 16- A). Lannan et al (1992) evidenciaram que a morfologia dos neutrófilos no estado quiescente exibe uma forma característica esférica e irregularidades na membrana celular com numerosas dobras (microvilosidades) em sua superfície (LANNAN et al., 1992). O aumento da área da membrana citoplasmática dos neutrófilos está diretamente relacionado com as dobras e vilosidades, que representam um reservatório de membrana para a célula. Assim durante deformações que exigem um aumento na área como no processo de fagocitose, a membrana aumenta sua área total a partir desse reservatório, suavizando as microvilosidades, conferindo à célula superfície plana e de aspecto liso (FINGER et al., 1996; HERANT et al., 2005).

Entretanto, os PMNs em contato com NPs de TiO₂ são estimulados e alterações na morfologia celular são observadas, relacionadas com as modificações ocorridas na membrana e no citoesqueleto pela organização das fibras de actina (TAMURA et al., 2004). Essas modificações foram observadas neste estudo nos tempos 5, 30 e 60 minutos de interação das células com as NPs (Figura 16- F, G, H).

No tempo 1 minuto, embora as células apresentassem morfologia com formato esférico, muitas imagens de células mostraram aglomerados de NPs aderidas na superfície da membrana, as quais demonstraram forte adesão. Apesar dos procedimentos de sucessivas lavagens (PBS, HBSS) as NPs permaneceram aderidas a superfície celular (Figura 16- E). Esse fato pode estar associado com o aumento da rigidez celular, considerando-se que os resultados de espectroscopia de força atômica demonstraram na comparação das médias do parâmetro *maximum loading force* entre controle e neutrófilos tratados com NPs de TiO₂ que houve

diferença estatisticamente significativa apenas no tempo 1 minuto, indicando aumento da rigidez celular, nesse tempo. Corroborando esse dado, Herant et al., (2005) demonstraram que neutrófilos estimulados com partículas de poliestireno apresentavam aumento da tensão cortical da membrana celular e progressiva rigidez de sua superfície, bem como das estruturas do citoesqueleto. Em ensaios de fagocitose os autores demonstraram que a interação dos neutrófilos com esferas de poliestireno (diâmetros de 2 μm , 3 μm , 4,5 μm , 6 μm , e 10 μm) incubadas com soroalbumina (BSA) e com imunoglobulinas policlonais de coelho sempre resultou em quase imediata firme adesão das esferas (em segundos) à superfície da célula e que a fagocitose de partículas maiores que 3 μm ocorria logo após o contato íntimo com a membrana celular (HERANT et al., 2005).

As alterações da morfologia celular após exposição a partículas de TiO_2 não foi uniforme no tempo 5 minutos, observando-se células com intensa modificação da sua forma e células com formato esférico, demonstrando diferentes padrões de estimulação (Figura 16- F). Isto pode relacionar-se com substrato, pH, agregação das NPs e o grau de estimulação da célula. Oakes et al.(2009) afirmou que a eficiência quimiocinética da migração dos neutrófilos é maior em substratos mais rígidos. Por meio de polarização e repetitivos ciclos de expansão, adesão, contração e reexpansão (ciclos de modificação da forma: corpo, lamelipódia, uropódia) os neutrófilos são capazes de migrar através de vários ambientes extravasculares em um curto período de tempo, interpretando vários sinais extracelulares a partir de uma variedade de fontes (ex: TiO_2), para dirigir sua migração (OAKES, 2009). Intensa ativação celular no tempo 5 minutos foi observada com imagens frequentes do glicocálice recobrando a membrana plasmática (Figura- 17). Essa matriz extracelular composta de glicolipídios, esfingolipídios, glicoproteínas e proteoglicanas, protege a célula contra agressões físicas e químicas, retém nutrientes e enzimas e participa da comunicação intercelular (SABRI et al., 2000).

Um aspecto importante a ser discutido diz respeito à influência da concentração e tamanho das NPs e as alterações da morfologia celular. Gonçalves et al., (2010) mostraram que concentrações de NPs de TiO_2 acima de 20 $\mu\text{g/mL}$ (0-100 $\mu\text{g/mL}$) promoveram deformações marcantes na morfologia dos neutrófilos com retardo na apoptose em 24 hs (GONÇALVES et al., 2010). Kumazawa et al., (2002) demonstraram por MEV que somente partículas de TiO_2 com 1 a 3 μm foram

fagocitadas por neutrófilos. A membrana celular dos PMNs expandiu em soluções com concentração de 10 ppm de TiO_2 e a superfície tornou-se mais complexa promovendo expansão da membrana em comparação com o grupo controle (KUMAZAWA et al., 2002). Da mesma maneira, Tamura et al., (2002) afirmaram que partículas de TiO_2 com 2 μm tornaram a superfície celular lisa enquanto partículas de 10 a 45 μm ou maiores promoveram pouca alteração na morfologia celular (TAMURA et al., 2002). Watari et al. (2009) observaram deformações celulares e fagocitose em NPs de TiO_2 com 500 nm enquanto partículas maiores que 10 μm não foram fagocitadas (WATARI et al., 2009). As NPs de TiO_2 neste estudo tiveram diâmetro hidrodinâmico médio em torno de 200nm e concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$, o que de acordo com Watari et al., (2009) aumenta sobremaneira a área de superfície específica das NPs possibilitando acentuada reatividade química e toxicidade o que pode ter influenciado os resultados de viabilidade celular onde as NPs de TiO_2 na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$ alteraram a frequência de células vivas, em função do aumento do tempo de exposição (30 e 60 minutos), (Figura 14). Entretanto Gonçalves et al., (2010) afirmaram que NPs de TiO_2 ativaram neutrófilos em concentrações de 0-100 $\mu\text{g/mL}$, bem como não observaram necrose em experimentos cinéticos por 24 hs. Em ensaios com concentrações $\geq 20 \mu\text{g/mL}$ as NPs de TiO_2 inibiram a apoptose de neutrófilos de forma dependente da concentração, por igual período de 24 horas (GONÇALVES et al., 2010).

Um aspecto morfológico observado nos tempos 30 e 60 minutos de exposição às NPs de TiO_2 foi a presença de extensões tubulares (nanotubos, citonemas, extensões tubulovesiculares), (Figura 16- G e Figura 18- I e J). As extensões apresentavam dois aspectos morfológicos, conforme aqueles enunciados por Galkina et al (2001, 2009, 2012): (1) extensões tubulovesiculares altamente dinâmicas e flexíveis com as extremidades não aderidas ao substrato (rompem-se facilmente com os procedimentos de manipulação das amostras, como por exemplo:lavagens), (Figura 16- G), (2) extensões retilíneas com extremidades planas ou achatadas, conectando as células ao substrato ou a células vizinhas a grandes distâncias (Figura 18- I, J). As extensões podem representar mecanismos utilizados pela célula para adesão (ferramenta para ligação intercelular e apreensão), sensorial, transporte, bactericida e comunicação, tornando-se mais abundantes em número e comprimento, de forma tempo dependente (GALKINA et al., 2001). Podem ainda participar da captação de partículas para fagocitose

mediada fundamentalmente por Óxido Nítrico endógeno ou exógeno (GALKINA et al., 2009).

Os resultados obtidos por MEV demonstraram, nos tempos de 5, 30 e 60 minutos, imagens compatíveis com vesículas (bolhas) na superfície da membrana celular (Figura 18- L, 60 minutos) as quais não foram observadas no grupo controle, nos respectivos tempos analisados. Essas vesículas têm sido associadas com injúria e morte celular. A Zeiose (vesículas ou bolhas) é uma protuberância irregular na membrana plasmática de uma célula causada pela dissociação localizada dessa membrana do citoesqueleto. A formação de vesículas na superfície da membrana plasmática tem funções importantes em vários processos celulares, incluindo a locomoção celular, divisão celular, injúrias por tensões físicas (ex.: NPs) ou químicas e apoptose (ANGUS et al., 2008; CHARRAS, 2008; CHARRAS et al., 2008).

Levando-se em consideração os resultados aqui obtidos e a intensa distribuição de vesículas na superfície das células, em tempos diversos (5, 30 e 60 minutos) pode-se pressupor que as NPs de TiO_2 promovem uma ação tóxica na superfície da membrana após estimulação. Durante a interação com NPs metálicas as células podem apresentar zeioses na superfície da membrana celular, sugestivas de injúria oxidativa (RANA, 2008). Comparativamente, Finch et al., (1987) analisaram a interação de macrófagos alveolares pulmonares com NPs de TiO_2 , Ni_3S_2 e nanoesferas de vidro. Utilizando microscopia de luz, de varredura e de transmissão avaliaram a viabilidade celular, a composição das NPs, bem como a morfologia celular. Como resultados, observaram diferentes estágios de alterações da superfície da membrana celular, incluindo a formação de zeiose com inúmeras vesículas, nanoporos, desgranulação e morte celular (FINCH et al., 1987). Recentes trabalhos detalhados, de Hussain et al. (2009 e 2010) revelaram que células da linhagem epitelial brônquica humana (16HBE14o) e células brônquicas primárias humanas expostas a NPs de TiO_2 (15 nm) e de carbono black CB (13 nm) exibiram aspectos morfológicos (redução do volume celular, vesículas ou bolhas (zeiose) condensação periférica de cromatina e formação de corpos apoptóticos) e bioquímicos (ativação de caspases e fragmentação do ADN) de apoptose (HUSSAIN et al., 2009; HUSSAIN et al., 2010). Babiychuk et al., (2011) afirmaram que as vesículas podem atuar como áreas de proteção nos segmentos de membrana com injúria e são seladas por tampão de anexina A1- a Ca^{2+} e proteína de ligação de membrana (BABYCHUK et al., 2011). Dessa forma as vesículas observadas nos

ensaios realizados podem representar uma barreira às NPs ou uma resposta celular com liberação de proteínas (ex.: lactoferrina, lipocalina, mieloperoxidase, catepsina G e defensinas) pelos grânulos citoplasmáticos para a superfície do plasmalema. Outro fato a ser considerado é que a localização das vesículas foi predominante na área da uropódia e pouco ou ausente na área da lamelipódia (Figura 18- L). Isto corrobora com os achados de Grinnel, (1982), que observou a formação de vesículas na região da uropódia de neutrófilos na superfície de fibras de colágeno, em ensaios de migração. Quando essas vesículas estavam presentes o movimento da célula cessava e a lamelipódia fina e plana dava lugar a uma pseudopódia (GRINNELL, 1982). Essas vesículas apresentavam na parede interna um citoplasma cortical periférico (composto por uma rede densa do citoesqueleto) contínuo a membrana citoplasmática (externa) voltada para o citosol, por onde poderia ocorrer a exocitose de organelas (SENDA et al., 1975).

Outra consideração morfológica diz respeito a possibilidade de formação de poros na membrana após a queda dos citonemas ou pela ação da NPs de TiO_2 , como vistos nas Figura 18- K e L. Correlacionando a nanoporos Galkina et al., (2009) enfatizaram que as extensões tubulovesiculares (citonemas) podem ter duas características 1- formação a partir da membrana plasmática 2- extrusões provenientes de invaginações do corpo da célula e que após sua separação dessa superfície dá lugar a uma depressão cujas estruturas são semelhantes a poros (porossomos), representando cavidades circulares de 0,4 a 1,2 μm de diâmetro, contendo 3 a 4 depressões, cada uma com 100 a 150 nm de diâmetro (GALKINA et al., 2009). Conforme evidenciado por Jena (2004) essas depressões podem ser consideradas a fusão de poros onde as vesículas secretórias e grânulos fundem-se e depositam seu conteúdo na membrana (JENA, 2004). Conforme demonstrado pela Figura 16- G, as extensões tubulovesiculares (citonemas) são vulneráveis aos procedimentos laboratoriais para MEV.

Da mesma maneira como citonemas estão relacionados a poros, as NPs de TiO_2 podem relacionar-se com o aumento da permeabilidade da membrana plasmática pela formação de nanoporos ou até do rompimento completo da membrana. Como já dito anteriormente os resultados observados na (Figura 18- K, L) nos tempos 30 e 60 minutos demonstraram a presença de poros na membrana plasmática. A formação de poros por NPs na membrana foi proposta por Mecke et al. (2004), usando microscopia de força atômica (MECKE et al., 2004). A formação

desses nanoporos aumenta a permeabilidade da membrana e pode ainda ocorrer a captação das NPs por endocitose ou por difusão. O transporte de NPs de ouro (39 nm) foi demonstrada em *oócitos de Xenopus*, onde a velocidade de transporte dependeu do tamanho das nanopartículas (PANTÉ; KANN, 2002). Já foi demonstrada a ruptura da integridade da membrana plasmática quando tratadas com NPs contendo grupos carregados positivamente (tal como polímeros: polietilenamina e poliamidoamina) nas suas superfícies (HONG et al., 2004).

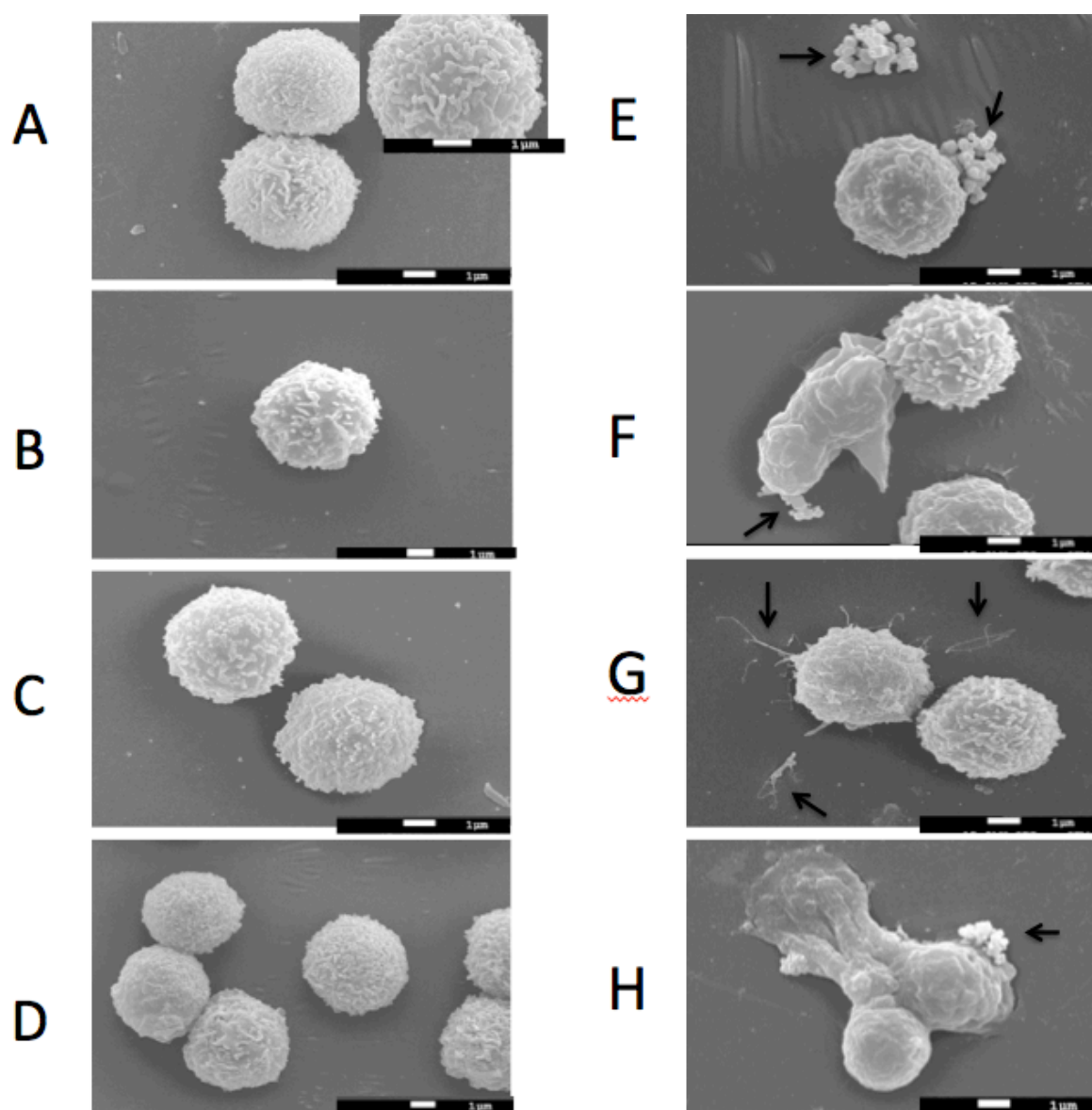


Figura 16- Microscopia Eletrônica de Varredura de Neutrófilos Controles A, B, C, D. Neutrófilos ativados por NPs de TiO_2 (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ E, F, G, H. Tempos nas duas condições: 1 (A e E), 5 (B e F) 30 (C e G), 60 minutos (D e H) A: superfície da membrana com microvilosidades. G: extensões tubulovesiculares (citronemas). E, F, H: nanopartículas de TiO_2 e células com deformação da morfologia.

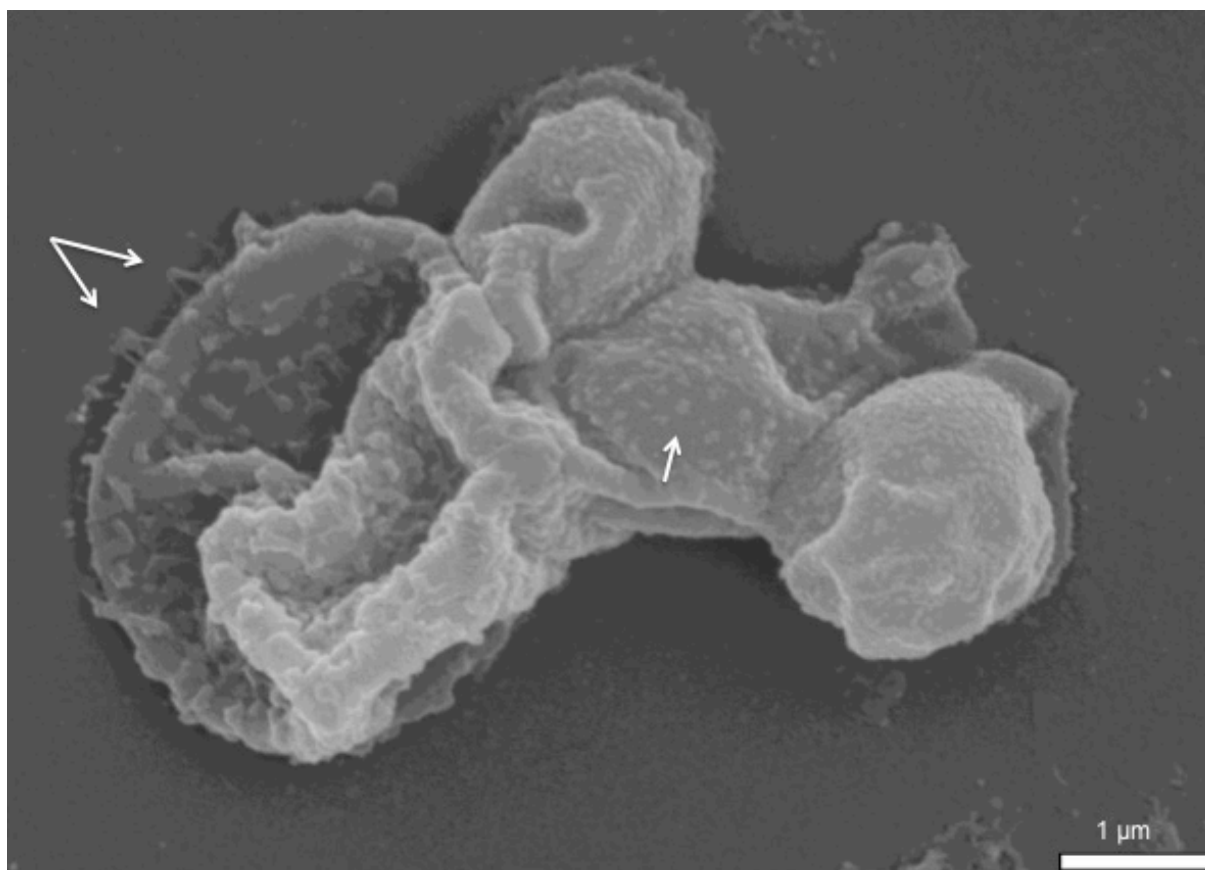


Figura 17- Imagem por Microscopia Eletrônica de Varredura de neutrófilos ativados por NPs de TiO_2 ($200 \mu\text{g/mL}$) durante 5 minutos. Presença de Glicocálice na membrana na região da lamelipódia (seta dupla) e remanescentes das microvilosidades superficiais ou vesículas (seta única).

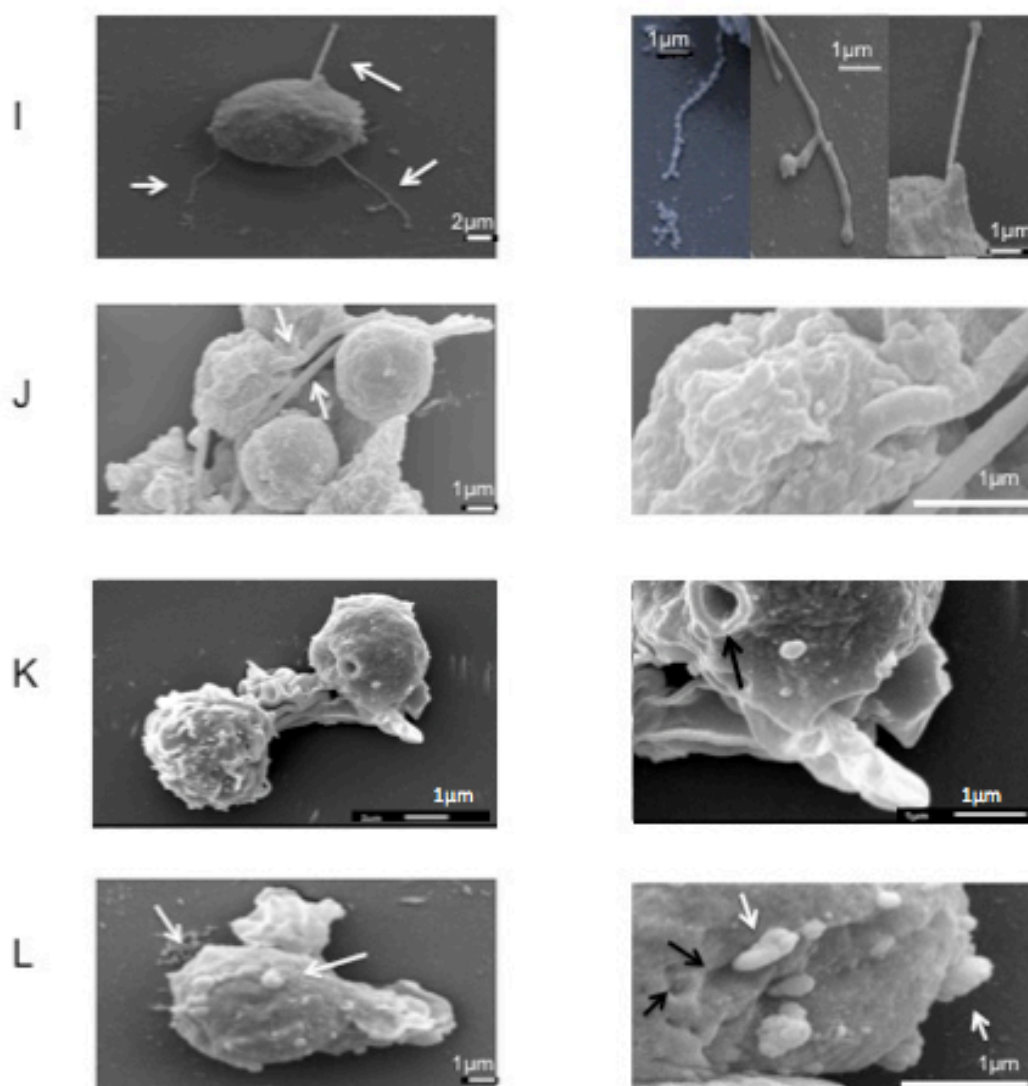


Figura 18- Imagens de neutrófilos ativados por NPs de TiO_2 (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 30 minutos; (I, J) extensões tubulovesiculares (citonemas), setas brancas; (K, L) nanoporos, (setas pretas); (L) vesículas na superfície da membrana na região da uropódia, setas brancas. As imagens representam três experimentos análogos.

5.3.2.1 NPs de TiO₂ foram detectadas em neutrófilos após análise elementar por dispersão de raios-X.

A análise elementar e o mapeamento das amostras foram realizadas por energia dispersiva de raios-X (*EDX*, *EDS*).

A Figura 19, mostra a imagem representativa das células estimuladas por NPs de TiO₂ (30 minutos), o espectro obtido por *EDX* de duas células (pontos 1 e 2) e uma tabela com os elementos detectados com suas intensidades. Foram detectados os elementos C, O, Na, Mg, O, Al, Si, Au e Ti. Os elementos Na, Al e Si foram originados das soluções, lamínulas e do substrato, Au da metalização das amostras para aumentar a condutância para MEV. Os espectros de *EDS* confirmaram a presença de Ti, nas células.

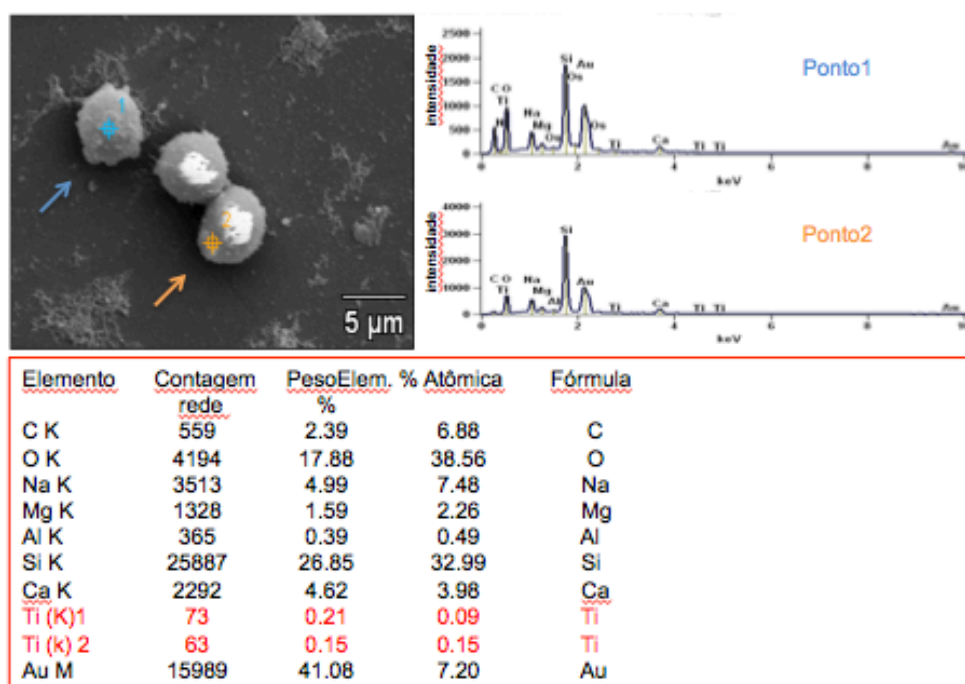


Figura 19- Espectro obtido por EDX de duas células, detectando os elementos Au, C, Na, Mg, O, Al, Si, e Ti. Sódio, Al, Si, originados do substrato, lamínulas e soluções, Au da metalização das amostras para MEV, no tempo 30 minutos. (Representativo das médias de 3 experimentos).

5.3.3 Neutrófilos alteraram sua morfologia e internalizaram NPs de TiO₂ por análise de Microscopia de Transmissão

A morfologia dos neutrófilos e a distribuição dos agregados de nanopartículas de TiO₂ foi analisada por microscopia de transmissão, nos tempos 5 e 60 minutos e comparada com seus respectivos controles (figura 20- A, B, C e D) e a figura 21 representa a interação das NPs de TiO₂ no tempo 5 minutos (E, F, G e H). No grupo controle as células apresentaram aspecto esférico com microvilosidades na superfície da membrana e a presença de organelas subcelulares distribuídas no citoplasma. Um grande número de grânulos primários (azurofílicos) foram vistos no citoplasma, distribuídos uniformemente, apresentando tonalidades de cinza claro a escuro com diferentes formatos aos 5 e 60 minutos (Figura 19- A e B). Esse fato foi evidenciado por Saito et al., (1998) que demonstrou por MET com coloração (*immunogold staining*) com NPs de ouro (10-15 nm) e anticorpos para Mieloperoxidase em neutrófilos quiescentes que havia predominância dos grânulos primários (mieloperoxidase positivos), os quais eram heterogêneos na sua forma, tamanho e densidade com 300 a 800 nm de diâmetro (SAITO et al., 1998).

A figura 20 em C, D (5 e 60 minutos) e a Figura 21 em E, F, G e H (5 minutos) demonstram as marcantes alterações ocorridas na ultraestrutura celular após o tratamento dos neutrófilos com NPs de TiO₂. Para caracterização, os agregados de NPs aparecem com uma imagem de diminutos pigmentos de coloração escura na Figura 21- E, F, G, H (setas pretas). Aos 5 minutos observou-se intensa modificação da morfologia com as células apresentando perda das microvilosidades da membrana celular e estágios morfológicos diferentes, decorrentes do aumento de sua área (Figura 20- C1 e C2). Tal achado pode relacionar-se com diferentes momentos de ativação dos PMNs, dimensões e forma das partículas, a área superficial específica, a concentração, a polidispersibilidade e diversos parâmetros do meio (pH/concentração iônica, composição, etc.), (JIANG et al., 2008; PEREIRA, 2010). Valant e Drobne (2011) compararam os efeitos de diferentes concentrações de NPs de TiO₂ (1,10,100,1000 µg mL⁻¹) e partículas com 10 e 30 nm, sobre o epitélio glandular digestivo de crustáceos (*Porcellio scaber*). Os resultados demonstraram que o tamanho primário das partículas (10 nm) e a área superficial estavam relacionados com o efeito biológico. Partículas maiores, com tamanho primário de 30 nm também desestabilizaram significativamente a membrana celular, mas apenas em altas concentrações de 100 ou 1.000 µg mL⁻¹(VALANT ; DROBNE,

2011).

A figura 21 mostra a presença de agregados de NPs de TiO_2 no interior da membrana plasmática no tempo 5 minutos (E, H). Os mecanismos de endocitose das NPs de TiO_2 ainda são controversos, mas citam-se fagocitose mediada por clatrina (preferencial), por caveolina, via independente de clatrina/caveolina, macropinocitose e difusão passiva pela membrana, (GEISER et al., 2005, ARORA et al., 2010). Busch et al., 2011 mostraram que NPs de TiO_2 foram captadas em 60 minutos, por diferentes tipos celulares fagócitos ou não fagócitos (queratinócitos humanos-HaCaT, células epiteliais de adenocarcinoma de pulmão- A549, linhagem celular de monócitos- THP1, linhagem de células oligodendroglial de rato- OLN93, monócitos e linfócitos primários) por diferentes mecanismos de captação e localizaram-se no citoplasma no interior de vesículas lisossomais (lisossomos), (BUSCH et al., 2011). Neste estudo a captação foi constatada nas imagens de MET dos neutrófilos na Figura 21- E e H. Ainda foram observados agregados de NPs partículas livres aderidos ou próximos a membrana plasmática (Figura 21- E, F, G e H). Nesse tema, Scherbart et al. (2011) ressaltaram que a endocitose de TiO_2 por macrófagos pulmonares (*NR8383 rat*) ocorreu por fagocitose dependente de actina, macropinocitose bem como vesículas revestidas de Clatrina em NPs finas (> 100 nm) e que a captação das NPs ultrafinas (< 100 nm) ocorreu preferencialmente por interação com FcγIIIR (CD32), (SCHERBART et al., 2011b). Entretanto, Geiser et al., (2005) observaram que a captação de partículas ultrafinas de ouro e poliestireno (< 100 nm) não ocorreu por processos de endocitose conhecidos mas por difusão ou interações de adesão, em macrófagos pulmonares de suínos e hemácias humanas (GEISER et al., 2005). O tamanho das partículas é um parâmetro primordial quando se considera a análise das interações celulares com NPs. De acordo com Watari et al., (2009), o aumento da área de superfície específica nos nanomateriais provoca aumento acentuado da reatividade química e toxicidade em materiais solúveis ou em suspensões. As dimensões das partículas determinam sua interatividade nos sistemas biológicos. Os materiais no interior desses sistemas tornam-se biointerativos quando seu tamanho está abaixo do tamanho das células, ou seja cerca de $10 \mu\text{m}$ ou inferior e conduz à conversão das funções biológicas (WATARI et al., 2007). Esses autores ainda destacaram os tamanhos críticos dos materiais em relação a transição entre bioreatividade e a caracterização do comportamento bioinerte: o tamanho crítico do nanomaterial significa que abaixo de 200 nm ele

torna-se invasivo as estruturas do organismo levando a incapacidade de reconhecimento do nanomaterial pelo sistema imune (WATARI et al., 2007; WATARI et al., 2009). Da mesma forma, Hamilton et al., (2009) demonstraram em ensaios com macrófagos alveolares interagindo com nanoesferas (60~200 nm) e nanofitas (60~300 nm), *in vivo* e *in vitro* (viabilidade celular, citocinas e catepsinas, produção de EROs, citometria de fluxo, MET e MEV) que a citotoxicidade do nanomaterial (ex.:TiO₂) depende mais do seu tamanho do que da sua composição, levando a uma inabilidade dos macrófagos em reconhecer e "sequestrar" as NPs no interior de lisossomos (funcionais) no meio intracelular (*fagocitose frustrada/processo celular defectivo*), resultando em liberação de catepsina B e formação de um inflamassomo (HAMILTON et al., 2009). A captação das NPs TiO₂ mediada por uma via independente da organização do citoesqueleto (fagocitose) envolvendo a ativação do inflamossomo NLRP3 com secreção de IL-1 β e IL-1 α foi demonstrada em queratinócitos e macrófagos por Yazdia et al., (2010), (YAZDIA et al., 2010).

As imagens da figura 21- E, F, G, H mostram a presença do glicocálice (imagem de linha escura) na superfície da membrana plasmática de neutrófilos ativados pelas NPs de TiO₂. O glicocálice tem papel fundamental nos processos de adesão celular intercelular ou a NPs. A modulação do glicocálice é um meio fisiológico de regulação da adesão celular, envolvendo um mecanismo de liberação de sialidases para membrana e a inativação de CD- 32 (Fc γ IIIR) e CD- 43 (leucosialina) com aumento da eficiência de adesão pelas glicoproteínas pela diminuição da carga negativa (SABRI et al., 2000). Grinnel (1982) demonstrou por MET neutrófilos revestidos com um extenso glicocálice, e NPs de colágeno foram, por vezes, observadas aderidas a essa matriz (GRINNELL, 1982).

Nas imagens das células onde foi possível uma definição morfológica da lamelipódia e da uropódia, os grânulos citoplasmáticos apareceram deslocados, em maior número, desde o centro para a área da uropódia (Figura 20- C1). Grinnel, (1992) observou por MET neutrófilos ativados em substrato de colágeno. Na área da lamelipódia foram observadas dobras e extensões largas que continham uma rede cortical densa de citoesqueleto e as organelas celulares foram deslocadas, na sua maior parte para o uropódia (GRINNELL, 1982).

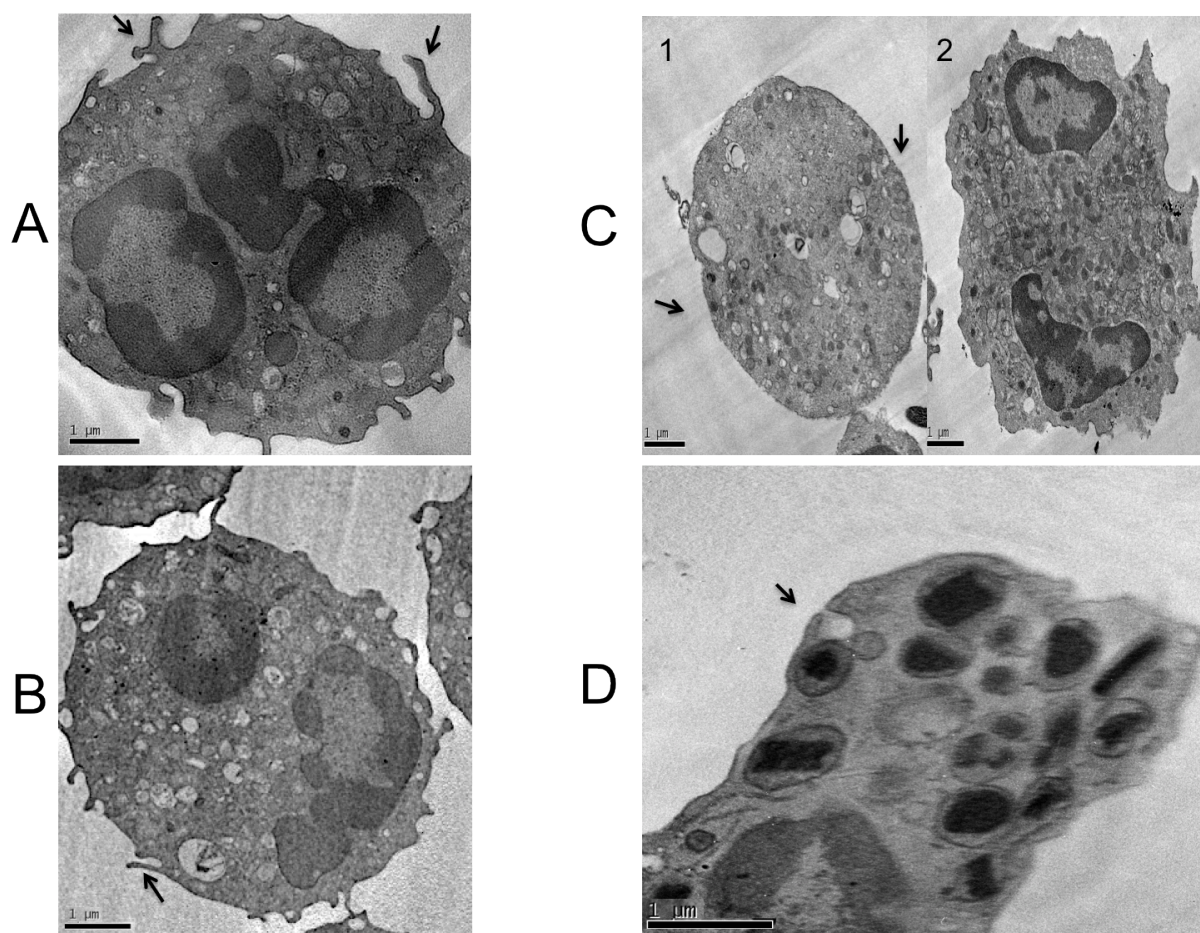


Figura 20- Imagens por Microscopia de Transmissão de neutrófilos com 5 e 60 minutos de exposição a NPs de TiO_2 (A, B, C e D). A e B- imagens de neutrófilos controles com 5 e 60 minutos, respectivamente, com a presença de microvilosidades (setas pretas). C1, C2 e D- imagens de neutrófilos com 5 e 60 minutos de exposição a NPs de TiO_2 (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$), respectivamente, com marcantes alterações da morfologia. C 1- maior concentração dos grânulos e vesículas na área da uropódia (setas pretas). D-Pseudópodes precursores de uma vesícula (seta preta). e intensa coloração de grânulos.

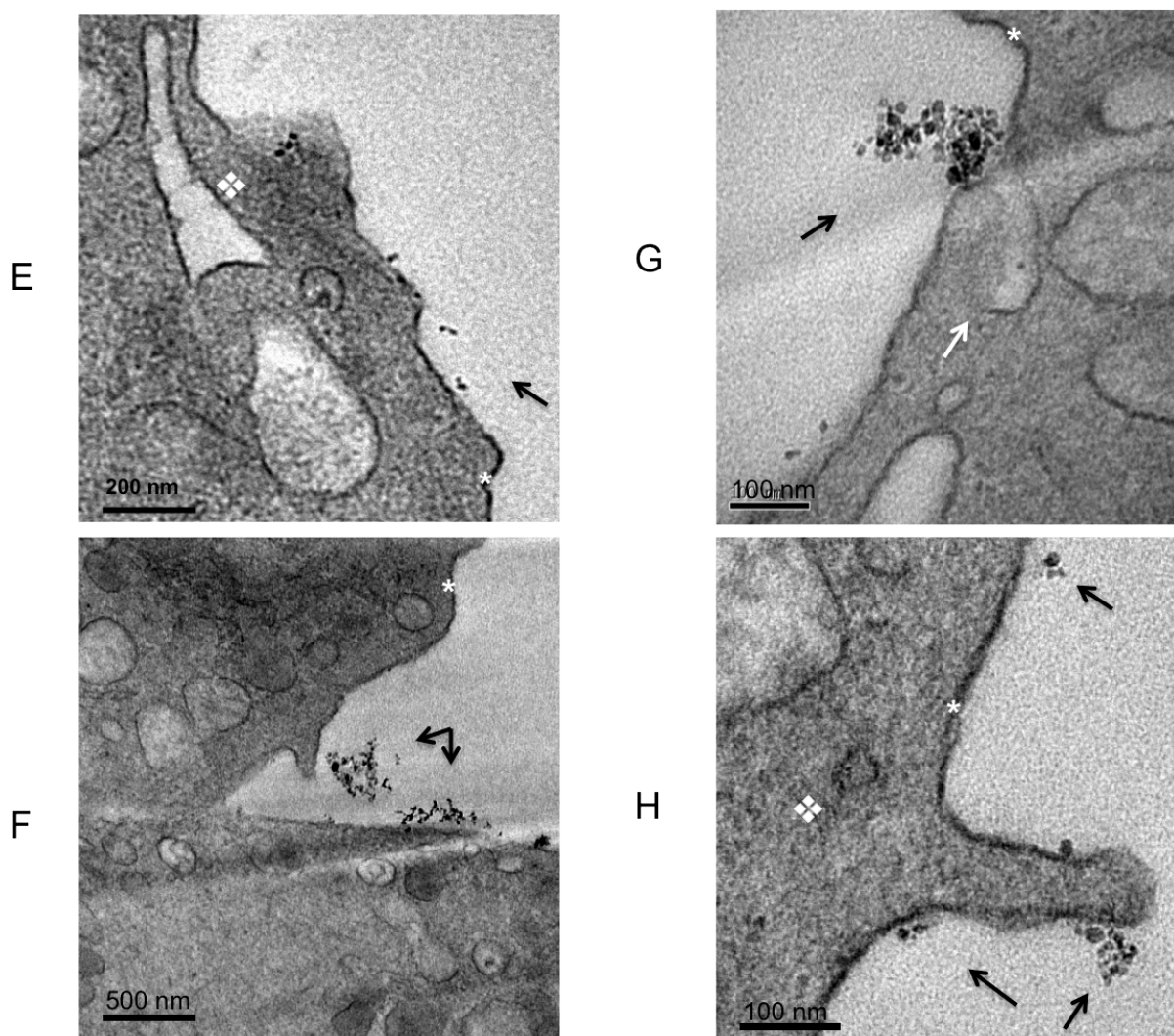


Figura 21- E, F, G, H- imagens de neutrófilos 5 minutos de exposição a NPs de TiO_2 ($200 \mu\text{g/mL}$) por Microscopia de Transmissão. E, F, G, H- NPs próximas ou aderidas à membrana plasmática (setas pretas); G- vesícula aderida à membrana (seta branca) e aglomerados/agregados de NPs de TiO_2 aderidos a membrana que já apresenta deformação (seta preta); E, F, G, H- Glicocálice, aparece como tênue linha escura, interagindo com aglomerados de NPs (estrelas brancas); E, H- aglomerados de NPs no interior da membrana plasmática (trevo branco).

5.4 Avaliação da Fagocitose- a fagocitose de NPs de TiO₂ pelos neutrófilos é tempo dependente

5.4.1 Microscopia de luz

A análise por microscopia de luz demonstrou a potencial capacidade de fagocitose dos PMNs frente a NPs de TiO₂ nos tempos 1, 5, 30 e 60 minutos. Os valores obtidos estão representados na Figura 22, com média \pm erro padrão da porcentagem de células com imagens compatíveis com partículas fagocitadas nas condições Experimental e Controle em cada um dos tempos avaliados. Houve diferença estatisticamente significativa entre as condições ($F_{1,2}=4323,063$, $p<0,001$). O fator tempo também apresentou efeito significativo sobre a porcentagem média de células com partículas fagocitadas ($F_{3,6}=3715,054$, $p<0,001$). O primeiro minuto apresentou a menor porcentagem de células fagocitárias ($p<0,001$ em todos os casos). No quinto minuto a porcentagem foi menor que no minuto 30 ($p=0,008$). Não houve diferenças significativas entre o minuto 30 e 60 ($p>0,99$). A interação Condição \times Tempo mostrou efeito significativo sobre a porcentagem média de células fagocitárias ($F_{3,6}=3715,054$, $p<0,001$). A análise *pos hoc* com ANOVA de medidas repetidas mostrou que existe diferença entre os tempos exclusivamente na condição Experimental ($F_{3,6}=3715,054$, $p<0,001$). O primeiro minuto apresentou a menor porcentagem de células fagocitárias ($p<0,001$ em todos os casos). Durante o minuto 5 a porcentagem foi menor que durante o minuto 30 ($p=0,008$).

Os resultados demonstram que a capacidade de fagocitose dos neutrófilos tem uma relação tempo dependente já que houve efeito significativo no número de células fagocitárias ao longo do tempo, atingindo uma estabilização nessa capacidade nos tempos 30 e 60 minutos. A média do tempo 1 minuto apresentou diferença significativa em relação aos tempos 5, 30 e 60 minutos e isto pode ser atribuído ao tempo necessário para o reconhecimento do antígeno (NPs de TiO₂), o estímulo para organização do citoesqueleto, montagem do complexo NADPH oxidase, adesão e início da fagocitose. Entretanto, Herant et al., 2005 demonstraram que partículas com raio maior que 3 μm foram fagocitadas imediatamente após o contato dos neutrófilos com microesferas revestidas com imunoglobulina e aquelas esferas com raio menor ($\approx 1,2 \mu\text{m}$) a fagocitose iniciou 15 minutos após a adesão.

Em outro ensaio com MEV observamos no tempo 1 minuto de exposição, aglomerados de NPs de TiO₂ na superfície da membrana dos neutrófilos(

Figura 21-E). Os resultados demonstram que há uma correlação direta significativa entre a média do número de células com imagens compatíveis com partículas fagocitadas e o curso de tempo.

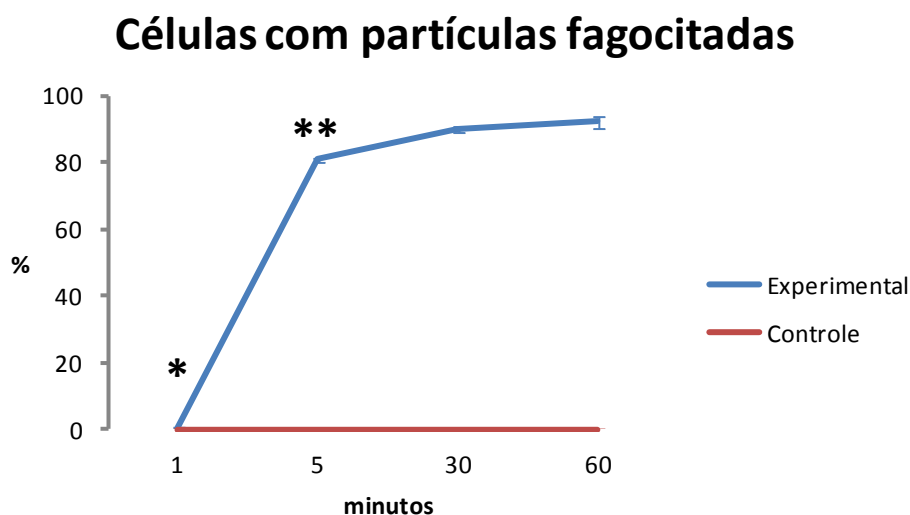


Figura 22- Média \pm erro padrão da porcentagem de células com imagens compatíveis com partículas fagocitadas nas condições Experimental e Controle em cada um dos tempos avaliados. *: Primeiro minuto menor que os outros tempos. **: diferença significativa entre o Quinto minuto e os tempos 30 e 60 minutos.

5.4.2 Neutrófilos alteraram intensamente sua morfologia e migraram para fagocitar aglomerados de NPs de TiO_2 por Videomicroscopia.

Os experimentos de Videomicroscopia realizados conforme descritos na metodologia demonstraram que as NPs (aglomerados) de TiO_2 estimularam os PMNs e promoveram deformação da morfologia e migração celular. A ativação de vias de fagocitose ocorreu mesmo sem a opsonização das NPs de TiO_2 .

Uma rápida mudança na morfologia celular ocorre em resposta ao estímulo das NPs de TiO_2 , sugerindo que os neutrófilos polarizam o citoesqueleto e migram para o mediador inflamatório. Durante um período médio de 4 minutos as células permaneceram estacionárias, podendo-se observar, nessa fase imagem sugestiva de intenso metabolismo no citoplasma, sugerindo a reorganização do citoesqueleto. Paralelamente a isto verificou-se no perímetro externo da membrana a formação de imagens semelhantes a vesículas ou bolhas denotando intensa atividade metabólica

ou fagocitose de NPs, cuja visualização é limitada devido a resolução do microscópio óptico. O movimento de quimiotaxia das células foi aleatório e constante em direção ao gradiente de aglomerados/agregados de NPs de TiO₂, mas uma vez ativada sempre apresentou a morfologia com uma área de lamelipódia (com grande mobilidade) e outra de uropódia bem definidas. Oakes et al., (2009) observaram movimentos lineares e aleatórios em neutrófilos sobre géis de poli(acrilamida) recobertos com fibronectina, percorrendo maior distância em substratos rígidos (OAKES et al., 2009). A taxa de migração celular (quimiotaxia) de uma célula para cada experimento (triplicata) foi de $336 \pm 42 \mu\text{m/h}$. Sabe-se que a taxa de migração para fMLP foi de $390,0 \pm 35,2 \mu\text{m/h}$, IL-8 de $428,9 \pm 94,9 \mu\text{m/h}$ e inibidor "m" de calpaína $228,3 \pm 86,9 \mu\text{m/h}$ (LOKUTA; NUZZI; HUTTENLOCHER, 2003).

5.5 Avaliação da Ativação de Neutrófilos

5.5.1 Neutrófilos ativados com NPs de TiO₂ e quiescentes apresentaram valores equiparados de expressão dos receptores de adesão de membrana CD-62L e CD-11b.

A expressão das moléculas selectinas e integrinas na superfície de neutrófilos está relacionada com as propriedades de adesão dos PMNs. A marcação da superfície de neutrófilos humanos que foram estimulados com NPs de TiO₂ na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$ durante 30 minutos *in vitro* demonstrou, pelo controle da expressão das moléculas CD-62L e CD-11b, que não houve diferença estatisticamente significativa entre o ativador TiO₂ e os controles em ambos os marcadores (anti-CD-11b e anti-CD-62L).

A figura 23 mostra a comparação dos valores medidos de intensidade de fluorescência do marcador anti-CD62L entre controles, neutrófilos estimulados com NPs de TiO₂ e fMLP. A média da intensidade de fluorescência das amostras tratadas com TiO₂ foi similar aquela observada nos controles, demonstrando que os agregados de NPs não utilizam a via das selectinas para adesão à membrana ou a captação ocorreu por difusão passiva como enfatizado por Geiser et al., (2005), (GEISER et al., 2005) e Arora et al (2010), (ARORA et al., 2010). Entretanto a marcação com anti-CD-62 L mostrou que o grupo TiO₂ apresentou diferença significativa em relação ao neutrófilos estimulados com fMLP. Em relação a esse

resultado deve-se considerar que essa glicoproteína transmembranar (tipo I) é expressa por todos os neutrófilos do sangue. L-selectina interage com ligantes sialilados expressos pelo endotélio e está envolvida no rolamento e durante a ativação (pode estimular também a ativação de integrinas β_2) é clivada (enzimática) da superfície dos leucócitos (FERAH et al., 2012). Esse fato pode explicar a menor abundância de CD-62L em neutrófilos ativados. Especificamente, sabe-se que quimiotáticos como fMLP entre outros (LPS, IL-8, C5a) tiveram efeito inibitório na expressão de CD 62-L *in vitro* (LUSCINSKAS et al., 1992). Entretanto, Sabroe et al., (2002) demonstraram aumento da expressão de selectinas após estimulação com LPS (SABROE et al., 2002) e em outro estudo semelhante ocorreu aumento de expressão com fMLP (SABROE et al., 2003). Gonçalves et al., 2010 demonstraram que os neutrófilos são ativados quando estimulados com NPs de TiO₂, apresentando rápida fosforilação com a expressão de duas MAPCinases, ERK-1/2 e p38. Smolen et al., (2000) demonstraram que a transdução de sinais pelos neutrófilos, como resultado de agregação de L-selectina utiliza p38 MAPK para os efeitos de alteração da morfologia, ativação das integrinas e liberação de grânulos secundários, terciários e secretórios (SMOLEN et al., 2000). Apesar disso, os resultados aqui obtidos não permitem afirmar que as NPs de TiO₂ utilizem essa via para a ativação dos neutrófilos.

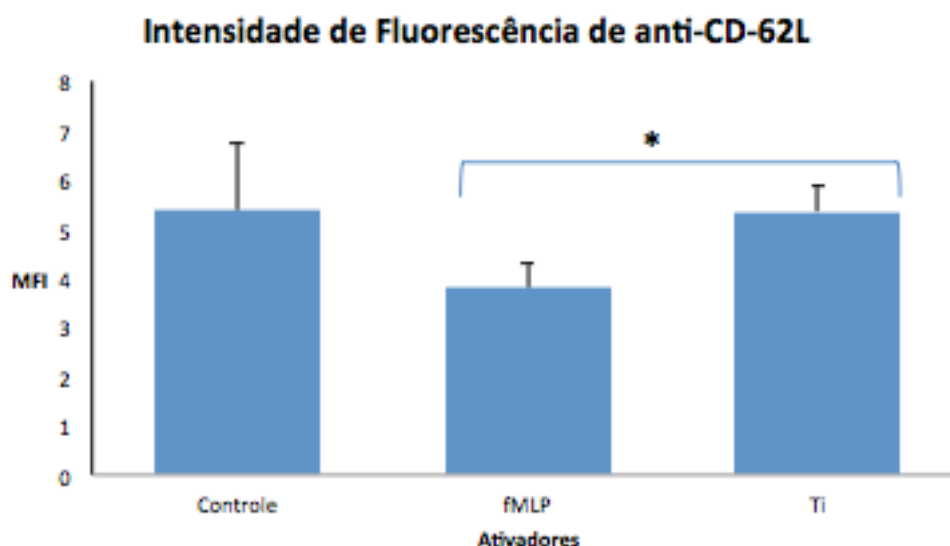


Figura 23- A intensidade média de fluorescência (MFI) do marcador anti-CD 62L foi medida por citometria de fluxo após 60 minutos de incubação nas amostras de neutrófilos quiescentes,ativados por fMLP e por NPs de TiO₂, 200 µg/mL (3×10^5)

células para cada ativador). O "Controle" representa os neutrófilos quiescentes (por 30 min); "*fMLP*" representa os neutrófilos ativados por *N-formil-Metionil-Lauril-Fenilalanina* (100 nmol/L), por 30 min; 'Ti' representa os neutrófilos ativados por NPs de TiO₂, por 30 min. A presença do símbolo (*) representa diferença estatisticamente significativa entre "TiO₂" e "*fMLP*" ($p < 0,037$). *MFI é proporcional à quantidade de anticorpo que se liga às células, quanto maior a MFI, maior é a expressão de moléculas na superfície dos neutrófilos.

A figura 24 mostra a comparação dos valores medidos de intensidade de fluorescência do marcador anti-CD-11b entre controles, neutrófilos estimulados com NPs de TiO₂ e *fMLP*. A média da intensidade de fluorescência das amostras tratadas com TiO₂ não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação aos controles e ao grupo *fMLP*. Todavia, houve diferença significativa entre as médias de intensidade de fluorescência de neutrófilos estimulados com *fMLP* e a dos controles. A expressão significativa de CD-11b pelo estímulo com *fMLP* pode ser correlacionada com os ensaios de Anderson et al., (2000) demonstrando que a expressão de CD-11b foi aumentada em 120% para os neutrófilos controles expostas a esse ativador, durante 10 minutos, enquanto que o aumento foi de 110% para neutrófilos, que tinham sido pré-tratados com C3-transferase.

O aumento na expressão de CD-11b em neutrófilos é considerado um confiável marcador de ativação celular e migração. Entretanto muitas integrinas podem mediar fagocitose. Beller et al., (1982) destacaram que integrinas $\alpha M\beta_2$ participam da imunidade inata auxiliando na fagocitose, tendo como ligantes C3b e fibrinogênio (BELLER; SPRINGER; SCHREIBER, 1982). Neste estudo, não foi encontrada diferença significativa na expressão de CD-11b entre o grupo NPs de TiO₂ e controle. A análise dos dados nesses dois grupos demonstra que as populações celulares de membranas marcadas com anti CD-11b apresentaram similaridade na média da intensidade de fluorescência. Esses resultados podem indicar que a sub-expressão de CD-11b está associada ao fato das NPs de TiO₂ não ativarem os PMNs por essa via. Assim, Eriksson e Nygren, (2001) analisaram a expressão de receptores de adesão de neutrófilos do sangue total sobre superfícies laminadas de TiO₂. Demonstraram que as células aderiram ao titânio, através do receptor *FcγIII* (CD-16) ocorrendo inicialmente potenciação (*priming*) transitória. Entretanto, na primeira hora de adesão, a selectina-L, a subunidade αM de integrina, e o receptor

FcγIII apresentaram expressão reduzida. Não foi observada explosão respiratória nos PMNs, mas quando estimulados subsequentemente por zimosan opsonizado (segundo hit), apresentaram ativação (ERIKSSON; NYGREN, 2001a). Nesse mesmo assunto Silva, (2011), demonstrou a redução da expressão de selectina-L e CD-11b na membrana de neutrófilos independente da topografia da placa (lisa ou rugosa) e do tempo de exposição (SILVA, 2011).

Entretanto, quando considera-se as NPs de TiO₂ deve-se verificar o que foi exposto por Hamilton et al., 2010, em razão do tamanho diminuto das NPs de TiO₂ há uma inabilidade nos macrófagos alveolares, em não reconhecer as NPs de TiO₂ e "sequestrar" essas NPs no interior de lisossomos (funcionais) no meio intracelular (*fagocitose frustrada/processo celular defectivo*) o que pode ter levado a sub-expressão de CD 11b na superfície das membranas dos neutrófilos neste estudo em razão da captação das NPs ocorrer com sub expressão das integrinas (HAMILTON et al., 2009). Afirmção semelhante foi feita por Watari et al., (2009) enfatizando a caracterização do comportamento bioinerte, onde o tamanho crítico do nanomaterial faz que abaixo de 200 nm ele torne-se invasivo as estruturas do organismo levando a incapacidade de reconhecimento do nanomaterial pelo sistema imune (WATARI et al., 2007). Por outro lado, a presença marcante de pseudópodes observados neste estudo por MET sugerem uma via de fagocitose com participação de *FcγIII* (integrina CD-16). Isso foi evidenciado por Dupuy e Caron (2008) que citaram que distintas Rho-GTPases regulam a polimerização de actina e definem os diferentes fenótipos de fagocitose. Assim a fagocitose dependente de receptores *FcγR* (fagocitose tipo I) induz a ativação de Rac-1 e Cdc 42 com formação de pseudópodes e aumento das microvilosidades. Por outro lado, a polimerização da actina, na fagocitose dependente de integrinas αMβ₂ (fagocitose tipo II) é regulada pela atividade da proteína RhoA e as partículas são captadas sem a geração de grandes protrusões (pseudópodes) da membrana (DUPUY; CARON, 2008).

Outra via de captação das NPs de TiO₂ foi demonstrada por Scherbart et al., (2011) evidenciando que em macrófagos alveolares (linhagem *NR8383 rat*) a endocitose de partículas finas de TiO₂ (448,6 -936,6 nm) envolveu a fagocitose dependente de actina do citoesqueleto, macropinocitose e da formação de vesículas recobertas por clatrina enquanto as nanopartículas de TiO₂ ultrafinas (57,5-164,2 nm) semelhantes as deste estudo, foram internalizadas principalmente por *FcγIIIR* (CD 32) e em menor percentual pela via da clatrina (SCHERBART et al., 2011b).

A expressão diminuída de CD-11b também pode estar ligada a uma via de captação recentemente exposta pela literatura, a dos "inflamossomos" (complexo citoplasmático multiprotéico (oligomérico). Yazdia et al., 2010 utilizando macrófagos humanos (linhagem THP1) e NPs de TiO₂ (anatase, 20 nm ou rutilo, 80 nm) e de SiO₂ (15 nm), demonstraram por MET que as NPs (agregadas) estavam livres no citoplasma sem a presença de fagossomos ou lisossomos e estimularam (ligaram-se) a produção do inflamossomo *NLRP3* (*NLR pyrin domain containing 3*) e em cascata IL-1 β que estimulou a secreção de IL-1 α . A captação das NPs foi independente de *lipid rafts*, de actina, de caveolina ou de vesículas recobertas com clatrina (YAZDIA et al., 2010).

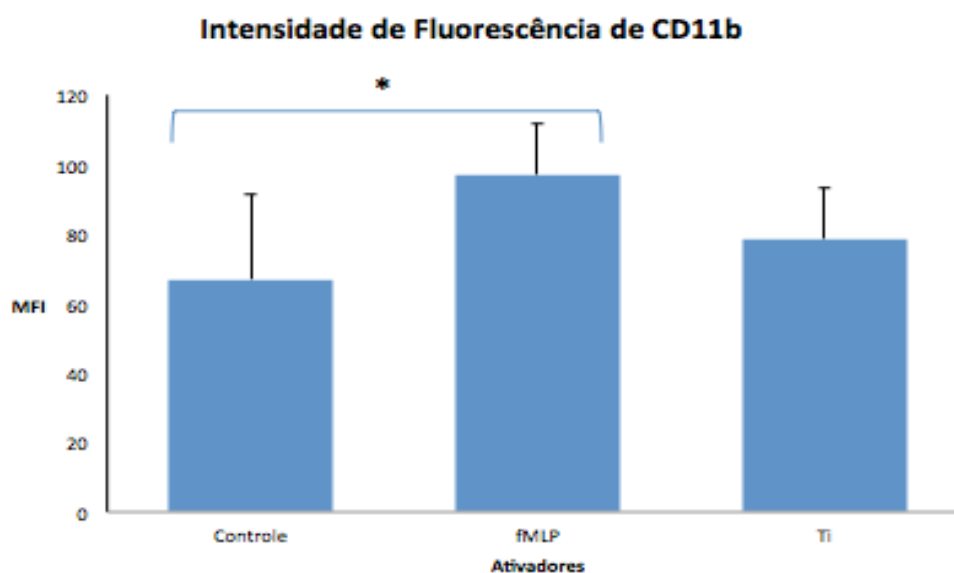


Figura 24 -A intensidade média de fluorescência (MFI) por células do marcador anti-CD-11b foi medida por citometria de fluxo após 60 minutos de incubação nas amostras de neutrófilos quiescentes, ativados por fMLP e por NPs de TiO₂, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (3×10^5 células para cada ativador). Anti CD-11b foi usado para detectar a expressão da subunidade αM da integrina. O "Controle" representa os neutrófilos quiescentes, por 30 min; "fMLP" representa os neutrófilos ativados por *N-formil-Metionil-Lauril-Fenilalanina* (100 nmol/L), por 30 min; "Ti" representa os neutrófilos ativados por NPs de TiO₂ (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$), por 30 min. O símbolo (*) representa diferença estatisticamente significativa entre "fMLP" e "controle" ($p=0,036$).

* Anexo B- demonstra a possível via metabólicas de fagocitose de NPs de TiO₂, mediada por αM2β utilizadas pelos neutrófilos.

* Anexo C- demonstra a possível via metabólica de fagocitose de agregados/aglomerados de TiO₂ por integrinas *FcyIII* (CD-16).

5.5.2 Neutrófilos foram ativados por NPs de TiO₂ e produziram ânion superóxido pelo teste da redução do NBT.

Os experimentos realizados permitiram observar a redução do NBT por superóxidos produzidos pelos neutrófilos incubados com NPs de TiO₂ e os seus respectivos controles, ao longo do tempo (1, 5, 30 e 60 minutos). Os resultados obtidos (Figura 25) demonstraram um efeito estatisticamente significativo do fator condição sobre a porcentagem média de células ativadas ($F_{1, 2}=20183,258$, $p<0,001$). A porcentagem foi superior na condição Experimental (diferença média $65,9 \pm 0,5$). O fator Tempo também teve efeito significativo sobre a média de células ativadas ($F_{3, 6}=2288,958$, $p<0,001$). A porcentagem de células ativadas foi menor no primeiro minuto em comparação com os outros tempos ($p<0,001$ em todos os casos). A interação Condição × Tempo exerceu efeito estatisticamente significativo sobre a porcentagem média de células ativadas ($F_{3, 6}=1218,376$, $p<0,001$). As análises *post hoc* mostraram que essa diferença entre o primeiro minuto e os outros tempos só existiu na condição TiO₂ ($F_{3, 6}=2119,446$, $p<0,001$). Nessa condição o primeiro minuto teve menor porcentagem de células ativadas que os outros tempos ($p<0,005$ em todos os casos). O minuto 5 também apresentou média inferior aos tempos 30 e 60 minutos ($p=0,05$). Não houve diferença entre os tempos 30 e 60 minutos ($p=0,343$). Já na condição controle não houve diferença entre nenhum dos tempos avaliados ($F_{3, 6}=1,545$, $p=0,326$).

Os resultados do teste do NBT demonstraram que as NPs de TiO₂ promovem alterações enzimáticas com ativação da *NADPH* oxidase e produção de ânion superóxido. O que já havia sido demonstrado em partículas de 1-3 μm por Kumazawa et al., (2002), Tamura et al., (2002) e Tamura et al., (2004). (KUMAZAWA et al., 2002; TAMURA et al., 2002; TAMURA et al., 2004). Embora os metabólitos de oxigênio gerados pelos neutrófilos sejam necessários para o

mecanismo de defesa, esses radicais livres produzidos podem tornar-se citotóxicos, lesando o neutrófilo e os tecidos ao seu redor (WEISS; LOBUGLIO, 1982), pelo acesso direto às proteínas intracelulares, organelas e ADN (LI et al., 2003). Esses radicais liberados podem promover ainda a peroxidação de lipídios alterando a estrutura antigênica das membranas (celular, de grânulos e vesículas) conforme evidenciado por Hussain et al., (2010), que demonstrou NPs de TiO₂ promovendo peroxidação de lipídios e desestabilização da membrana do lisossomos, levando a liberação de catepsina B e subsequente ativação de caspases e os demais eventos de apoptose (HUSSAIN et al., 2010).

Como esperava-se a porcentagem média de células do grupo controle não apresentou diferença significativa nos tempos avaliados. Entretanto, a condição experimental mudou drasticamente esse panorama já que houve diferença significativa na porcentagem de células com produção de ânion superóxido a partir do minuto 5. Mesmo assim deve-se considerar que o minuto 1, embora com percentual médio estatisticamente significativo (menor) em relação aos outros tempos (5, 30 e 60 minutos), apresentou células com produção de ânion superóxido indicando que receberam estímulo das NPs de TiO₂ e portanto com potencial citotóxico se deixadas em maior tempo de exposição às NPs de TiO₂. As diferenças estatisticamente significativas das porcentagens médias entre os tempos 5, 30 e 60 minutos demonstram que a produção de ânion superóxido ocorre em escala crescente atingindo um *plateau* nos tempos 30 e 60 minutos, onde as porcentagens médias aproximaram-se. Esses dados também associam-se aos resultados obtidos nos experimentos de fagocitose e de microscopias de varredura e transmissão, onde observou-se uma correlação tempo-dependente nas mudanças morfológicas e a fagocitose das NPs.

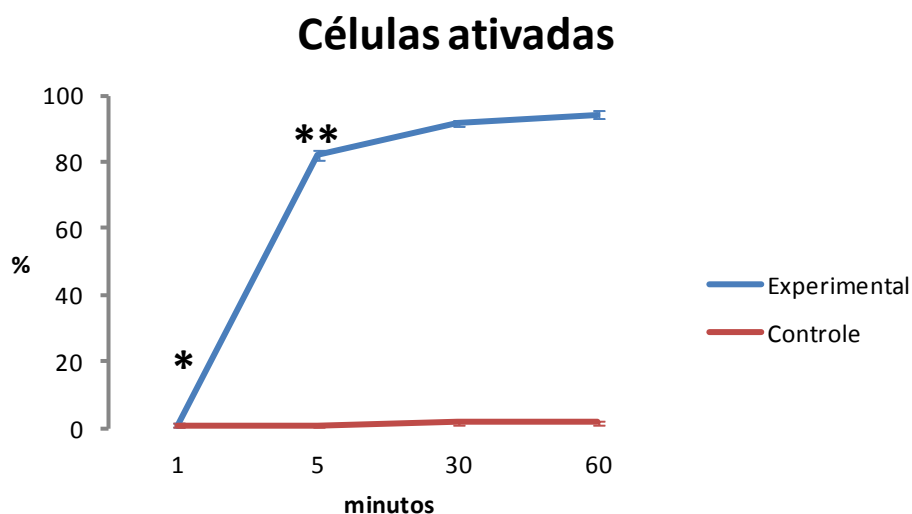


Figura 25- Média \pm erro padrão da porcentagem de neutrófilos ativados após interação com NPs de TiO_2 (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) nos tempos 1, 5, 30 e 60 minutos e os respectivos controles em cada um dos tempos avaliados. *: Primeiro minuto com diferença significativa em relação a todos os outros tempos. **: diferença estatisticamente significativa do Quinto minuto em relação aos tempos 30 e 60 minutos.

A figura 26 mostra as imagens das duas condições, controle e experimental representadas por neutrófilos quiescentes (A, B, C, D) e ativados (E, F, G, e H), nos tempos 1, 5, 30, e 60 minutos, para avaliação da redução do NBT. Os controles mantiveram sua morfologia esférica ao longo dos tempos avaliados. A média percentual dos neutrófilos incubados com NPs de TiO_2 apresentaram imagens de inclusões citoplasmáticas compatíveis com a redução do NBT, significando ativação e produção de superóxidos, nos tempos 5, 30 e 60 minutos (Figura 26- F, G e H, setas pretas). A imagem do tempo 1 minuto da condição experimental é representativa das médias percentuais que apresentaram diferença estatisticamente significativa (menor) em relação aos tempos 5, 30 e 60 minutos. Os detalhes das da Figura 25- E e H, mostram imagens de aglomerados/agregados de NPs de TiO_2 nos neutrófilos.

Finalmente, os dados obtidos corroboram com outros da literatura demonstrando a produção de ânion superóxido por neutrófilos e que as EROs em

células expostas a estresse oxidativo por NPs, podem representar o principal fator relacionado a toxicidade levando a diminuição ou ablação das funções celulares por estresse oxidativo (BARILLET et al., 2010; PETERSEN; NELSON, 2010; PUJALTÉ et al., 2011).

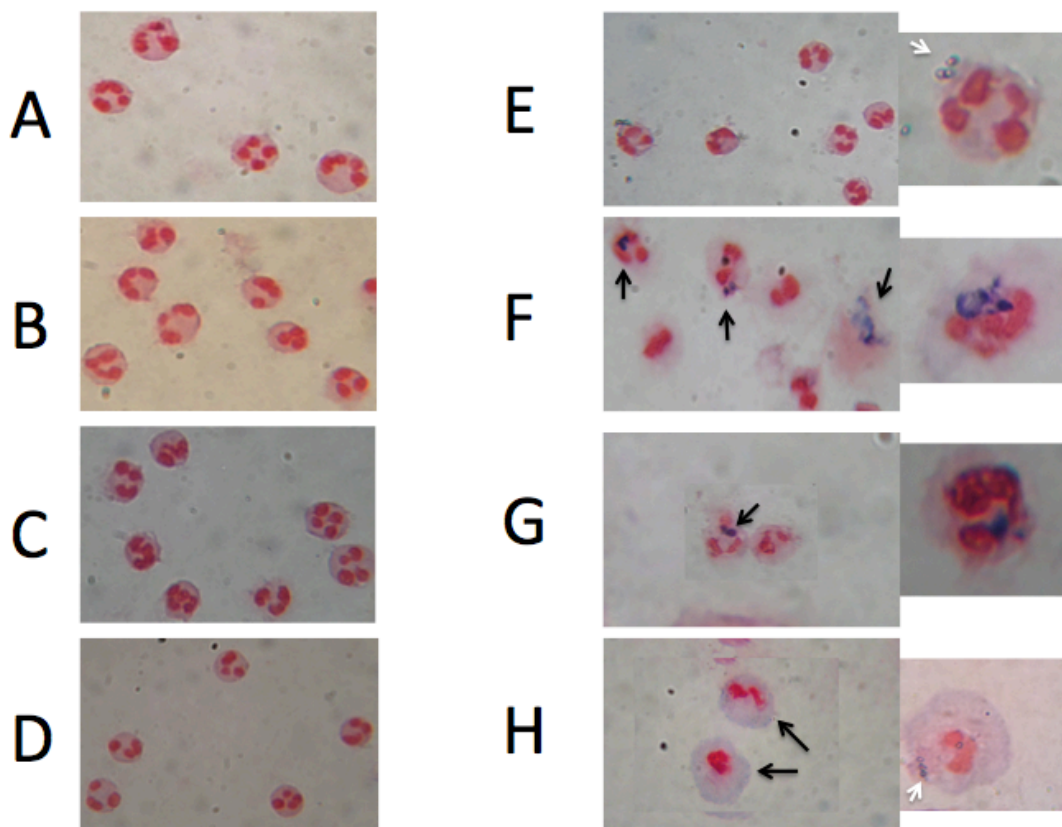


Figura 26– Imagens de neutrófilos controles (A, B, C e D) e de neutrófilos expostos a NPs de TiO_2 , 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (E, F, G e H) analisadas pelo teste do NBT (obtidas por microscopia de luz). As imagens A e E referem-se a células após 1 minuto de exposição, B e F, após 5 minutos, C e G, após 30 minutos e D e H, após 60 minutos. As imagens F, G, H demonstram a redução do NBT (coloração azulada-setas pretas) nos tempos 5, 30 e 60 minutos e representam a produção do ânion superóxido. A imagem H (60 minutos) mostra um padrão de dispersão do NBT no citoplasma (setas pretas) e aglomerados de NPs de TiO_2 na imagens H e E (setas brancas). Foram contadas 100 células, em lâminas de vidro, representativo da triplicata de três indivíduos. Aumento 400x.

5.6 Nanopartículas de TiO₂ aumentaram os valores da rigidez e elasticidade de neutrófilos por Espectroscopia de Força Atômica.

*Artigo enviado para publicação na Revista BMC Biophysics:

Kinetic effects of TiO₂ nanoparticles over nanomechanical properties of human neutrophils assessed by force spectroscopy.

MS ID: 1199179270820583

Author: Everton S Rosa

Journal: BMC Biophysics

Visando determinar os efeitos cinéticos das NPs de TiO₂ sobre as propriedades mecânicas dos neutrófilos e as alterações morfológicas ocorridas ao longo do tempo (1, 5, 30 minutos) as células foram analisadas por espectroscopia de força atômica e por MEV. As alterações nanomecânicas resultantes das interações das NPs de TiO₂ com neutrófilos mostraram aumento da rigidez e alteração da morfologia celular ao longo do tempo. O tratamento dos PMNs com NPs de TiO₂ promoveu ainda um aumento das forças de atração, de adesão, de dissipação de energia e da elasticidade. A investigação dessas interações representa um passo essencial para esclarecer os mecanismos envolvidos em tratamentos que contêm nanomateriais e a biodistribuição e biodisponibilidade das NPs nos organismos.

A figura 27 mostra a distribuição do diâmetro hidrodinâmico das NPs de TiO₂, onde aproximadamente 67% das NPs apresentaram em torno de 180 nm (ver tabela do resumo dos picos), as quais provavelmente comportam-se como as NPs de 200 nm descritas por Watari et al., (2009) as quais interagem com as células do sistema inato de defesa do organismo.

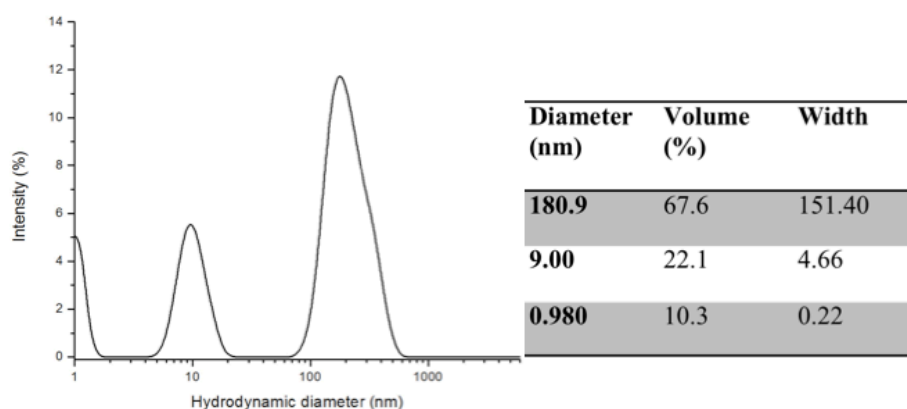


Figura 27- Resumo dos picos em relação a distribuição do diâmetro hidrodinâmico das NPs de TiO₂ .

O tamanho das partículas é um parâmetro primordial quando se considera a análise das interações celulares com NPs. De acordo com Watari et al., (2007, 2009) o aumento da área de superfície específica nos nanomateriais provoca aumento acentuado da reatividade química e toxicidade em materiais solúveis ou em suspensões. As dimensões das partículas determinam sua interatividade nos sistemas biológicos. Os materiais no interior desses sistemas tornam-se biointerativos quando seu tamanho está abaixo do tamanho das células, ou seja cerca de 10 μm ou inferior e conduz à conversão das funções biológicas (WATARI et al., 2007; WATARI et al., 2009). Esses autores ainda destacaram os tamanhos críticos dos materiais em relação a transição entre bioreatividade e a caracterização do comportamento bioinerte: o tamanho crítico do nanomaterial significa que abaixo de 200 nm ele torna-se invasivo as estruturas do organismo levando a incapacidade de reconhecimento do nanomaterial pelo sistema imune (WATARI et al., 2007; WATARI et al., 2009). Enfatizando essa propriedade Hamilton et al., (2009) afirmaram que a citotoxicidade do nanomaterial (ex.:TiO₂) depende mais do seu tamanho do que da sua composição, levando a uma inabilidade dos macrófagos em reconhecer e "sequestrar" as NPs no interior de lisossomos (funcionais) no meio intracelular (*fagocitose frustrada/processo celular defectivo*), resultando em liberação de catepsina B e formação de um inflamassomo, que pode resultar em resposta inflamatória e apoptose (HAMILTON et al., 2009).

A Figura 16 mostra imagens de MEV comparando neutrófilos não expostos a TiO_2 (A, B, e C) e neutrófilos expostos a NPs de TiO_2 (D, E, and F) após 1 minuto (A e D), 5 minutos (B e E), e 30 minutos (C e F), respectivamente. Foi possível observar alterações morfológicas ao longo dos tempos de exposição devido a influência das NPs de TiO_2 . Os neutrófilos alteraram seu estado quiescente (Figura 16- A, B, e C) para adquirir uma forma ativada, no intuito de fagocitar NPs (aglomerados) de TiO_2 (Figura 16- E, F e G). Há alguns estudos demonstrando alterações morfológicas similares as encontradas neste estudo, decorrentes da interação de NPs de TiO_2 com micro e nanopartículas, bem como de citotoxicidade demonstrada pelo aumento de lactato desidrogenase, ânion superóxido e citocinas próinflamatórias. Essas alterações foram inversamente proporcionais ao tamanho das partículas (KUMAZAWA et al., 2002; TAMURA et al., 2002; TAMURA et al., 2004).

Contudo, há pouco conhecimento em relação as alterações nanomecânicas de neutrófilos promovidas pela exposição a NPs de TiO_2 . Assim, a próxima etapa neste estudo foi avaliar os efeitos nanomecânicos sobre a superfície de neutrófilos promovidas por nanopartículas de TiO_2 , ao longo de intervalos de tempo pré-determinados, utilizando a técnica de espectroscopia de força.

Os resultados de espectroscopia de força derivam de curvas de força-distância medidas por uma ponteira de microscopia de força atômica com aproximações e afastamentos da superfície da amostra. Este evento é monitorado por um sinal de laser óptico, o qual reflete da superfície superior reflexiva de um *cantilever*. Forças de atração, repulsivas, e/ou adesivas podem ocorrer enquanto os movimentos da ponteira são desenvolvidos. O primeiro evento relacionado com a aproximação da ponteira envolve forças de atração (interações de *van der Waals* e de capilaridade) conhecida como *snap in*, na qual a ponteira salta para estabelecer íntimo contato com a superfície da amostra.

A Figura 28 mostra diferenças estatisticamente significativas das medidas de *snap in* entre controles e os neutrófilos tratados com NPs de TiO_2 após 1 e 5 minutos de exposição. A exposição as NPs de TiO_2 provocaram um aumento nas medidas das forças de *snap in* quando comparadas com os controles. Esses resultados foram relacionados com as alterações morfológicas após estimulação dos neutrófilos, como observado na Figura 16. O grupo controle teve um aumento tempo-dependente nos valores das medidas das forças de *snap in* de 1 a 30 minutos., enquanto as células expostas mostraram aumento nesses valores de 1 a 5 minutos. Além disso, diferença estatisticamente significativa ($P < 0.05$) foi ainda encontrada

entre as células expostas e seus respectivos controles para 1 e 5 minutos de incubação, mas não ocorreu no tempo 30 minutos. Esses dados podem representar que a ação de forças como *van der Waals* e eletrostáticas sobre a membrana celular seja mais intensa a medida que decorre o tempo de incubação. A interação das NPs com a membrana de neutrófilos e sua captação aumentaram as forças *snap in*. Essas forças estabilizaram-se em algum ponto próximas a 30 minutos, onde as interações com as NPs já não haviam demonstrado aumento dos valores medidos. Variações nas propriedades mecânicas da superfície das amostras como as de viscoelasticidade, forças de adesão bem como as soluções de fixação podem influenciar as oscilações do cantilever (GUDURU, 2011; SMITH, 2004). Por outro lado, deve-se considerar que as interferências nos valores medidos sobre a superfície dos neutrófilos estão relacionadas com nanopartículas aderidas ou próximas a membrana. As NPs de TiO_2 podem provocar interações com a ponteira em virtude do fenômeno de agregação/aglomeração das NPs, como visto na Figura 16- E e F (HALL et al., 2005). Por exemplo, em um estudo semelhante Guduru (2011) demonstrou que NPs de ácido poli-láctico-co-glicólico não revestidas (b-PLGA) tiveram interação com células de câncer ovariano (SKOV-3) e após 24 horas de incubação as NPs permaneciam na superfície das células (GUDURU, 2011). Deve-se considerar ainda que as NPs em contato direto com a superfície da membrana podem promover uma deficiência na comunicação com o meio externo (KIRCHNER et al., 2005).

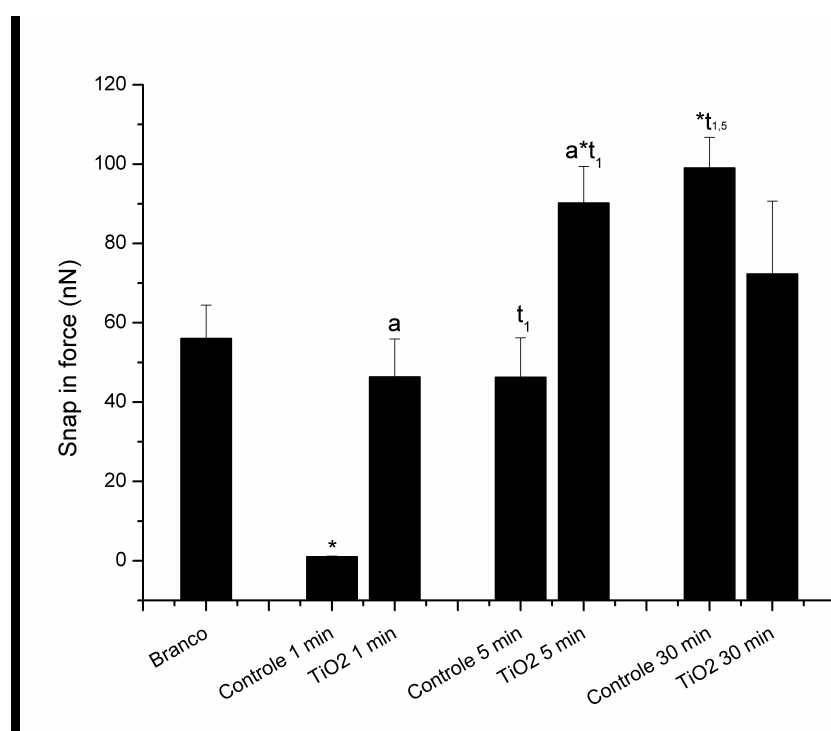


Figura 28– Forças *snap in* calculadas a partir de curvas de espectroscopia de força medidas por AFM operando em modo contato. “*Branco*” refere-se a análise da superfície de lâminula esférica de sílica sem amostras (10 mm), “*TiO₂ 1, 5 e 30 minutos*” refere-se a análise de curva de força obtida de neutrófilos aderidos em lamínulas esféricas de sílica (10 mm) e de neutrófilos expostos a NPs de TiO₂ por 1, 5 e 30 minutos. “*Controle 1, 5, e 30 minutos*” refere-se a neutrófilos aderidos a lamínulas de sílica (10 mm) sem qualquer tratamento celular com NPs fixados com os mesmos tempos das células tratadas (1, 5, e 30 minutos). A presença do símbolo (*) representa diferença estatisticamente significativa entre o “*Branco*” e as amostras ($P < 0.05$), (a) representa diferença estatisticamente significativa com o respectivo controle, “*t1*” com “*Controle 1 minuto*”, “*at₁*” com “*TiO₂ 1 minuto*” e “*t_{1,5}*” com “*Controle 1 minuto*” e “*Controle 5 minutos*” ($P < 0.05$).

O próximo evento que ocorre na curva de força de um experimento está associado com a força máxima aplicada na ponteira e diz respeito à dureza da amostra (Figura 29). A comparação das medidas do parâmetro *maximum loading force* entre controle e neutrófilos tratados com NPs de TiO₂ mostrou diferença estatisticamente significativa apenas no tempo 1 minuto de exposição. Interessante observar que em outros ensaios mecânicos os neutrófilos ativados foram duas vezes mais rígidos que células quiescentes (ROCA-CUSACHS; ALMENDROS I; SUNYER R; et al., 2006). Além disso, sob carga a membrana sofre uma deformação elástica não linear demonstrando um comportamento binário de rigidez e flacidez (MADDIGAN, 2004). O controle 30 minutos apresentou uma diferença estatisticamente significativa em relação ao controle 5 minutos ($P < 0.05$), sugerindo uma possível diminuição da rigidez das células quiescentes ao longo do tempo. Além disso, quando comparadas aos controles, os neutrófilos tratados com NPs de TiO₂ demonstraram forças maiores no tempo 1 minuto, o que pode representar aumento da rigidez celular como resultado da fagocitose das NPs ou adesão na superfície da membrana celular. Em relação a isto deve ser considerado que durante a fagocitose os neutrófilos ativados apresentaram aumento da tensão cortical da membrana associado a rigidez progressiva da superfície celular e das estruturas do citoesqueleto (HERANT et al., 2005).

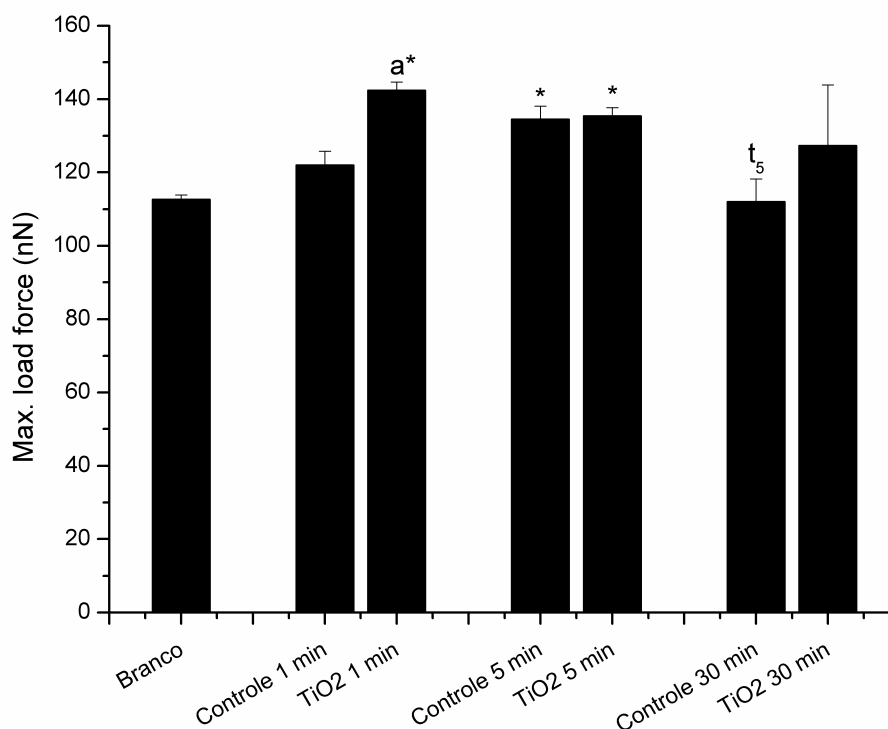


Figura 29- O parâmetro *maximum load force* foi calculado a partir de curvas de espectroscopia de força medidas por microscopia de força atômica, operando em modo contato. O “*Branco*” refere-se a análise de superfícies de lamínulas esféricas de sílica sem amostras (10 mm), “*TiO₂ 1, 5, e 30 minutos*” refere-se a análise de curva de força obtida a partir de neutrófilos fixados aderidos a lamínulas de sílica (10 mm) e expostos a tratamento com NPs de TiO₂ por 1, 5 e 30 minutos. “*Controle 1, 5 e 30 minutos*” refere-se a neutrófilos fixados aderidos a lamínulas de sílica (10 mm) sem qualquer tratamento com NPs de TiO₂, coletadas após os mesmos tempos das amostras tratadas (1, 5, e 30 minutos). A presença do símbolo (*) representa diferença estatisticamente significativa entre o “*Branco*” e as amostras ($P < 0.05$), (a) significa diferença estatisticamente significativa com o respectivo controle, e t₅ com o “*Controle 5 minutos*” ($p < 0.05$).

As medidas de *Detachment force* representam a relação com forças de adesão (ex: pontes de hidrogênio, atrações iônicas, forças de *van der Waals*, interações hidrofóbicas interações e/ou adesões químicas), (KENDALL, 1994). Esse parâmetro de espectroscopia de força ocorre ao final da curva de retração, correspondendo ao ponto onde a ponteira perde contato com a superfície da amostra, e está relacionado com interações de adesão entre ambos (BARBOSA, 2012). A figura 30 mostra diferença estatisticamente significativa ($P < 0.05$) entre os controles e neutrófilos

tratados com NPs de TiO_2 correspondendo a 1 e 5 minutos de exposição, evidenciando uma tendência de aumento desse aspecto mecânico após estimulação. As células uma vez estimuladas, apresentam polimerização de F-actina e as integrinas servem como ligação do citoesqueleto com a parede do endotélio ou com a matriz extracelular (GUDURU, 2011). Os controles nos tempos 1, 5, e 30 minutos demonstraram diferença estatisticamente significativa das lamínulas de sílica ($P < 0.05$). Isto representa forças de adesão mais intensas no vidro do que na superfície da membrana de neutrófilos quiescentes e mostra que as forças de adesão não são devido ao suporte das células. Da mesma forma, os neutrófilos tratados com NPs de TiO_2 em 1 e 5 minutos mostraram forças de separação menores do que a lamínula de sílica.

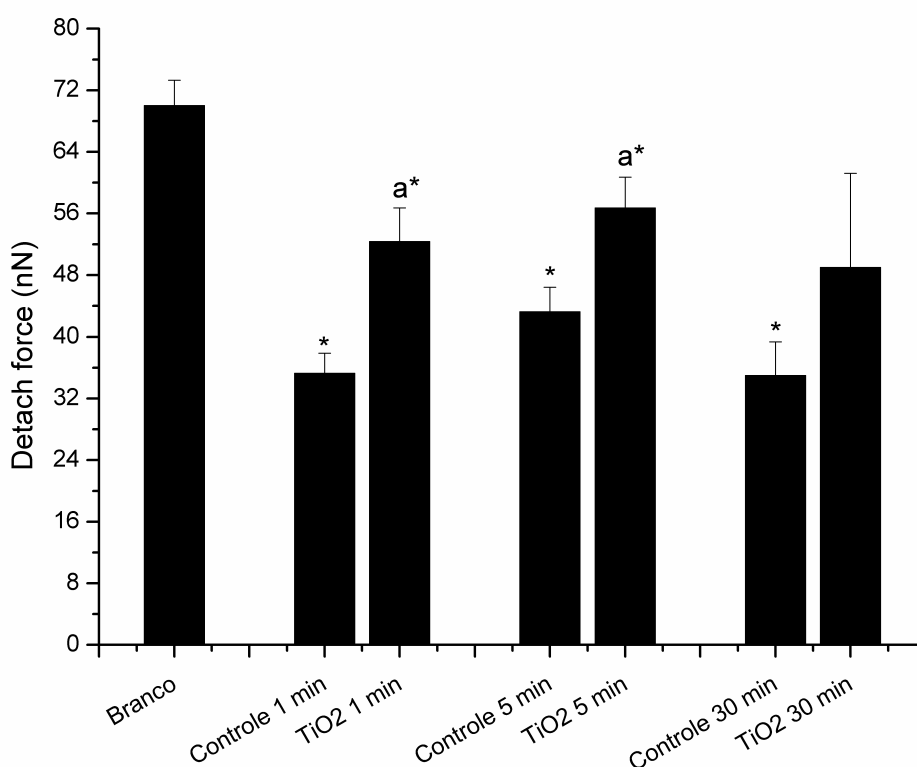


Figura 30– O parâmetro *Detachment force* foi calculado a partir de curvas de espectroscopia de força medidas por microscopia de força atômica, operando em modo contato. O “Branco” refere-se a análises da superfície de lamínulas esféricas de sílica sem amostras (10 mm), “ TiO_2 1, 5, e 30 minutos” refere-se análise de curvas de força obtidas a partir de neutrófilos aderidos em lamínulas esféricas de sílica (10 mm) e expostos a NPs de TiO_2 por 1, 5 e 30 minutos. “Controles 1, 5, e 30 minutos” refere-se a neutrófilos fixados aderidos a lamínulas esféricas de sílica (10 mm) sem qualquer tratamento com NPs de TiO_2 , coletadas após os mesmos tempos

das amostras tratadas (1, 5, e 30 minutos). Presença do símbolo (*) significa diferença estatisticamente significativa entre o “*Branco*” e as amostras ($P < 0.05$) e (a) significa diferença estatisticamente significativa com o respectivo controle ($P < 0.05$).

A seguir, a Figura 31 mostra a comparação dos valores medidos do módulo de Young entre controles e neutrófilos tratados com NPs de TiO_2 . Genericamente, esse parâmetro tem relação com propriedades de elasticidade e mecânicas. O módulo de Young das amostras tratadas foi menor que aquele observado nos controles, demonstrando um comportamento de elasticidade comparativamente maior ao longo do tempo. Neutrófilos dos Controles e aqueles tratados com NPs de TiO_2 no tempo 1 minuto demonstraram diferenças significativas estatisticamente ($P < 0.05$). No primeiro minuto as células quiescentes mostraram-se com maior rigidez em comparação com as tratadas. No tempo 5 minutos nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada. Isto pode estar relacionado com a ativação celular e organização do citoesqueleto no grupo TiO_2 aumentando sua rigidez. Além disto, uma marcante transição ocorreu aos 30 minutos, onde neutrófilos tratados apresentaram diferença estatisticamente significativa ($P < 0.05$), pressupondo-se intensa fagocitose e rigidez celular opondo-se a indentação da ponteira do cantilever. Resultados similares foram obtidos por Roca-Cusachs et al., (2006), os quais demonstraram maior rigidez de neutrófilos aderidos/ativados do que as células quiescentes (ROCA-CUSACHS; ALMENDROS ; SUNYER ; et al., 2006). As imagens das células nos tempos 5 e 30 minutos. (figura 16- F e G) mostraram alterações marcantes da morfologia representando possível estimulação, reorganização de F Actina e migração visando potencial fagocitose dos aglomerados de NPs.

A Figura 31 mostra ainda, que as células quiescentes ou controles tiveram um padrão de declínio nesse parâmetro dependente do tempo. Os controles nos tempos 5 e 30 minutos mostraram diferenças estatisticamente significativas em comparação com 1 min ($P < 0.05$). Esses aspectos levam a conclusão que o módulo de elasticidade das células quiescentes sofre redução ao longo do tempo (KUZNETSOVA et al., 2007). Extrapolando-se para o meio biológico, o processo de deformação celular implica no aumento da rigidez, facilitando adesão fraca dos neutrófilos às paredes dos capilares e subsequente firme adesão. Por outro lado, o aumento da elasticidade celular permitindo deformação gradual, facilitaria o

progresso da transmigração dos neutrófilos (ROCA-CUSACHS; ALMENDROS I; FARRÉ R; et al., 2006).

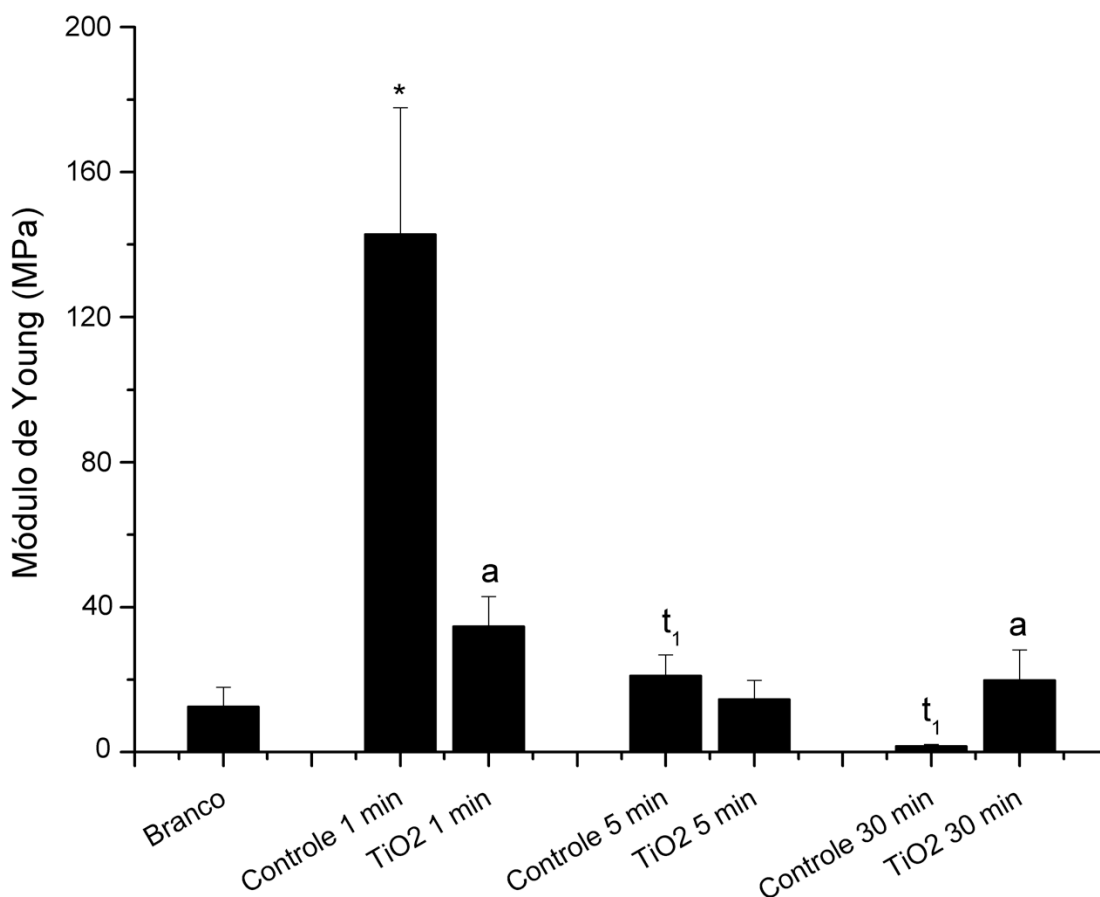


Figura 31– O módulo de Young calculado pela análise de espectroscopia de força medida por microscopia de força atômica, operando em modo contato. “*Branco*” refere-se a análise de lamínulas de sílica esférica sem amostras (10 mm), “*TiO₂ 1, 5 e 30 minutos*” refere-se a análise de curva de força obtida de neutrófilos fixados aderidos a superfície da lamínulas de sílica esférica (10 mm) e expostas a tratamento com NPs de TiO₂ nos tempos 1, 5 and 30 minutos. “*Controles 1, 5 e 30 minutos*” refere-se a neutrófilos fixados aderidos a lamínulas esféricas de sílica (10 mm) sem qualquer tratamento com NPs de TiO₂, coletados nos mesmos tempos da amostras tratadas (1, 5 e 30 minutos), a presença do símbolo (*) significa diferença estatisticamente significativa entre o Branco e as amostras ($P < 0.05$), (a) significa diferença estatisticamente significativa com o respectivo controle e t₁ do “*Controle 1 minuto.*” ($P < 0.05$).

Por último, a Figura 32 mostra o comportamento de dissipação de energia das células ao longo do tempo. Os resultados de Dissipação de energia resultam da interação da ponteira com amostra em função da distância e da distorção do cantilever (STOMP, 2005). Vorden et al (2011) evidenciou forças não-conservativas como sendo fortemente dependentes dessas interações (VORDEN et al., 2011). A dissipação de energia pode estar relacionada com as propriedades viscoelásticas das amostras (FOK; TANG, 2008). O principal contribuinte para dissipação de energia é o contato da ponteira com a superfície membrana celular (dupla camada lipídica) e o citoesqueleto. Os neutrófilos não apresentam superfície homogênea devido a sua composição interna: núcleo (região celular mais espessa: $\sim 5 \mu\text{m}$), citoplasma e citoesqueleto (SMITH, 2004), portanto nestas áreas espera-se a obtenção de diferentes medidas de força de indentação (NEUMANN, 2009). O citoesqueleto é uma rede polimérica composta de três distintos biopolímeros: filamentos de actina, microtúbulos, e filamentos intermediários com muitas proteínas acessórias (ANANTHAKRISHNAN; EHRLICHER, 2007). Em resposta ao TiO_2 , os neutrófilos são estimulados e remodelam o citoesqueleto aumentando sua rigidez provavelmente contribuindo para manifestação de propriedades mecânicas não-lineares e tempo dependentes. As medidas de dissipação de energia do grupo tratado com NPs de TiO_2 demonstraram um notável aumento desse parâmetro ao longo do tempo. Diferença estatisticamente significativa ($P < 0.05$) entre controles e neutrófilos tratados com NPs de TiO_2 NPs para 1 e 5 minutos de exposição foi observada e isto pode relacionar-se com a ativação dos neutrófilos contribuindo para um aumento da dissipação de energia. Outro aspecto que contribui para o aumento desse parâmetro é o efeito da captação das NPs pelas células concorrendo também para o aumento da rigidez celular. Em relação aos controles, a análise estatística evidenciou diferença significativa ($P < 0.05$) entre 30 minutos e os tempos 1 e 5 minutos. Deve-se observar que os neutrófilos quiescentes podem sofrer algum grau de organização do citoesqueleto e portanto tendência a aumentar sua rigidez ao longo do tempo contribuindo para o aumento da dissipação de energia a medida que a ponteira aproxima-se da amostra ou está em íntimo contato com essa superfície.

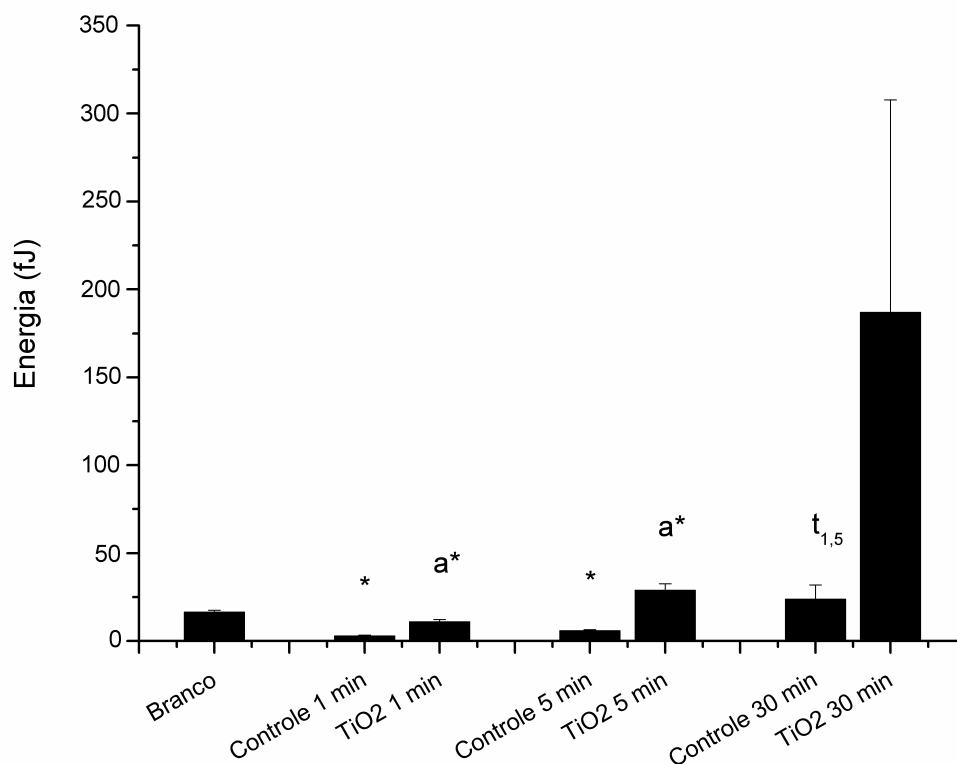


Figure 32– Energia dissipada calculada por análise de espectroscopia de força e medida por microscopia de força atômica, operando em modo contato. O “Branco” refere-se a análise de lamínula esférica de sílica (10 mm), “TiO₂ 1, 5 e 30 minutos” refere-se a análise de curva de força obtida de neutrófilos fixados e aderidos a lamínulas esféricas de sílica sem amostras (10 mm) e expostos a tratamento com NPs de TiO₂ por 1, 5 e 30 min. “Controles 1, 5 e 30 minutos” referem-se a neutrófilos fixados e aderidos a lamínulas de esféricas de sílica (10 mm) sem qualquer tratamento com NPs de TiO₂, coletadas após os mesmos tempos das amostras tratadas (1, 5 e 30 minutos). A presença do símbolo (*) significa diferenças estatisticamente significativas entre “Branco” e amostras ($P < 0.05$), (a) representa a diferenças estatisticamente significativas em relação ao respectivo controle e t_{1,5} para “Controle 1 minuto” e “Controle 5 minutos” ($P < 0.05$).

5.7 Produção dos géis bidimensionais.

Foi estabelecida a padronização da lise celular e produção dos géis bidimensionais para pesquisas de estimulação e ativação *in vitro*. Após a estimulação dos neutrófilos por 30 minutos com TiO_2 , realizamos a lise celular, com adição do tampão de lise e logo em seguida a dosagem de proteínas pelo método de *Bradford* modificado.

Os géis (vinte géis, sendo 10 géis Quiescentes e 10 géis de extratos protéicos de neutrófilos ativados com TiO_2 ($200\mu\text{g/mL}$), contendo $50\mu\text{g}$ de proteínas, foram focalizados em pH ácido de 4-7 no sistema IPGPHOR II por 21 horas em média, sendo que o procedimento foi limitado por volts-hora. A segunda dimensão foi realizada com corrente constante de 20 mA para cada gel, e submetidos a coloração de prata de alta sensibilidade.

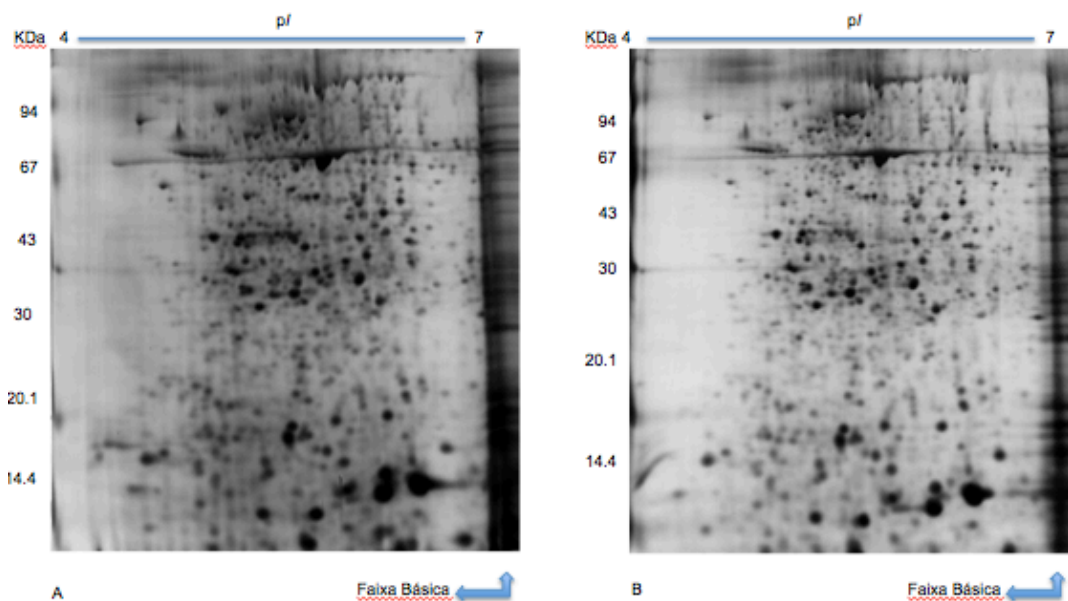


Figura 33- Géis bidimensionais com $50\mu\text{g}$ de proteínas em pH ácido de 4-7. (A) gel de neutrófilo quiescente e (B) gel de neutrófilos estimulados com TiO_2 ($200\mu\text{g/mL}$).

A quantidade estipulada de $50\mu\text{g}$ de proteínas foi padronizada para todos os géis produzidos em outros projetos da linha de pesquisas sobre proteômica de neutrófilo, pelo fato de apresentarem uma boa quantidade de *spots* detectáveis, de forma que esses não se agrupem e se consiga uma boa resolução para que a maioria dos *spots* contenha uma única proteína detectável tanto na análise de imagens quanto por espectrometria de massa.

5.8 Análise dos Géis

Para a adequação experimental e cronológica desse estudo adotou-se uma estratégia de análise dos *spots* que apresentaram maior intensidade e análise por *Peptide Mass Fingerprint* (PMF). Assim 7 *spots* foram escolhidos por apresentarem diferença estatisticamente significativa (testes de Kolmogorov-Smirnov (distribuição gaussiana), Wilcoxon (dados não-paramétricos), teste t-pareado (distribuição normal) e foram levados para identificação por espectrometria de massa. Em média obteve-se a detecção de 1220,5 *spots* na condição Quiescente e 1368,7 *spots* na condição titânio (Tabela I). Foram pareados 253 *spots* no gel Master Quiescente e 262 *spots* no gel Master TiO₂.

Tabela I- número de spots detectados na condição normal e na condição titânio.

| condição | Nº géis | Nº Spots pareados | Média Nº spots |
|------------------|---------|-------------------|----------------|
| Quiescente | 10 | 253 | 1220,5 |
| TiO ₂ | 10 | 262 | 1368,7 |

5.9 Identificação das Proteínas

A identificação por *PMF* foi realizada com a obtenção de peptídeos trípticos, por meio da clivagem das proteínas na posição C-terminal da lisina e arginina. Foram identificadas um total de 03 proteínas.

A caracterização dos *spots* com abundância diferencial foi validada por três critérios: 1) presença do *spot* em 5 ou mais géis em cada condição (Quiescentes/TiO₂); 2) significância estatística com $p \leq 0,05$; 3) razão das médias de volume normalizado com variações $v \geq 2$ com abundância diminuída para TiO₂ e $v \leq 0,5$ com abundância aumentada para TiO₂. O quadro V mostra os 7 *spots* com abundância diferencial.

Quadro V: *Spots* com abundância diferencial. Número do match é o número do *spot* do gel Master que parecia com outros géis, significância $p \leq 0,05$, razão das médias Q/Ti, presença nos géis Q (Quiescente) e Ti (TiO_2) e abundância diferencial estatisticamente significativa.

| Spots com abundância diferencial | | | | |
|----------------------------------|---------------|--------------------------------------|--------------------------|------------------------|
| Match ID | $p \leq 0,05$ | Razão das médias Q/Ti ($v \geq 2$) | Presença nos géis Q e Ti | abundância diferencial |
| 253 | 0,025 | 2,74 | 5Q / 6Ti | aumentada para Q |
| 522 | 0,041 | 2,66 | 9Q / 8Ti | aumentada para Ti |
| 587 | 0,038 | 2,39 | 9Q / 8Ti | aumentada para Q |
| 724 | 0,015 | 2,08 | 10Q / 10Ti | aumentada para Q |
| 815 | 0,050 | 2,19 | 10Q / 10 Ti | aumentada para Q |
| 867 | 0,018 | 2,70 | 10 Q / 8 Ti | aumentada para Ti |
| 1250 | 0,020 | 2,57 | 8Q / 8Ti | aumentada para Ti |

Quadro VI – Identificação protéica de neutrófilos por MALDI-TOF-TOF peptide mass fingerprinting.

^a Parâmetro de abundância: análise comparativa entre células quiescentes e incubadas com Ti:

↓Ti: Abundância diminuída na condição Ti

^bScore: Search score : a partir da análise peptide mass fingerprint utilizando programa Mascot contra o NCBI banco de dados não redundante.

^cC(%): porcentagem da cobertura da sequência da proteína pelos peptídeos correspondentes.

| Spot | Parâmetro de Expressão ^a | p-value | Número de acesso | Nome e Símbolo (UniPROT) | Atividades | pI (teor/exp) | Mr (teor/exp) (kDa) | Score ^b | C(%) ^c |
|------|-------------------------------------|---------|------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|---------------------|--------------------|-------------------|
| 724 | ↓Ti (2,08) | 0,015 | gi 57222338 | microfibrillar-associated protein 3-like isoform 2 (MFA3L-HUMAN) | -vias de sinalização da regulação da espermatogênese -diferenciação de células germinativas | 5.60 / 4.90 | 35 / 34 | 83 | 21 |
| 815 | ↓Ti (2,19) | 0,050 | gi 225698069 | Crystal Structure Of Hsc70/BAG1 IN COMPLEX WITH ATP | -catálise do desencapsulamento da rede de clatrina dependente de ATP. -diminui a expressão funcional e de superfície na membrana de canais de sódio . | 6.38 / 4.90 | 42 / 32 | 101 | 32 |
| | | | gi 169145172 | TRIO and F-actin binding protein (TRIOBP) (TARA, KIAA1662 HRIHFB2122HUMAN) | -regulação da organização do citoesqueleto, contração/expansão, migração e difusão celular, ligação e estabilização de F-actina | 5.67 / 4.90 | 28 / 32 | 94 | 36 |

5.9.1- Proteína 3-like (isoforma 2) relacionada a microfibrilas- MFA3L

A proteína MFA3L (*spot* 724) apresentou diminuição na abundância após estimulação com TiO₂ quando comparado ao quiescente com significância de 0,015, pelo teste t pareado, transformação logarítmica; razão de Q/Ti= 2,08, estando presente nos 10 géis das duas condições.

A proteína MFA3L (NYD-SP9) isoforma 2 tem abundância na membrana celular. É um tipo de proteína transmembrana de passagem única (*single-pass*) que possui um sinal de retenção interno que faz com que a proteína fique presa à membrana (α -hélice): peptídeo *stop-transfer*. Sabe-se que fibras elásticas da matriz extracelular são compostas por 90% de elastina e microfibrilas. Por sua vez as microfibrilas são compostas por várias proteínas destacando-se a glicoproteína fibrilina (350 KDa), MAGP (31KDa), enzima lisil-oxidase, emilina com 115 KDa e MFAP1 (Microfibrillar-Associated protein-1), distribuídas em uma variedade de tecidos (ABRAMS et al., 1995). O gene MFA3L é altamente expresso em células plasmáticas de pacientes com Gamopatia Monoclonal de Significância Desconhecida (MGUS), em 40 % de pacientes com Mieloma Múltiplo, células B de memória e células plasmáticas da medula óssea. Representa um gene ligado a um bom prognóstico em Mieloma Múltiplo. Esse gene codifica a proteína MFA3L cuja função é pouco conhecida. Kassambara et al., 2012 demonstraram a expressão do gene MFA3L em células B, T, monócitos, neutrófilos e osteoclastos (KASSAMBARA et al., 2012). A proteína foi relacionada a vias de sinalização da regulação da espermatogênese e na diferenciação de células germinativas (XIAO et al., 2002). O gene humano que codifica MFAP3 tem uma estrutura muito simples, contendo apenas dois exons traduzidos, codificando uma proteína de 362 aminoácidos. MFAP3 não parecem partilhar homologia com qualquer outra proteína conhecida. Esse gene foi localizado no cromossoma 5q32-q33.2, próximo do locus 5q21-q31 que corresponde ao gene FBN2 da fibrilina, geneticamente associada a aracnodactilia congênita, síndrome de Marfan. MFAP3 é um gene candidato ao desenvolvimento de doenças hereditárias que afetam microfibrilas, incluindo síndrome do prolapso da válvula mitral, ectasia aórtica, subluxação do cristalino familiar e síndrome de Marfan, sendo que outros estudos devem ser realizados para confirmar essas correlações (ABRAMS et al., 1995). Além disso, a possibilidade de MFAP3L estar envolvida na diferenciação de células plasmáticas maduras como neutrófilos necessita maior investigação, pois pode estar envolvida na interrupção do ciclo celular ou atuar de forma indireta nessas células .

5.9.2- Proteína Hsc70/Bag1 (estrutura cristalina), em complexo com ATP

No *spot* 815 foram identificadas duas proteínas: a proteína Hsc70/Bag1 (estrutura cristalina) em complexo com ATP e a proteína *TRIO F-actin binding protein*. Esse *spot* apresentou diminuição na abundância após estimulação com TiO₂, com significância de 0,050 e pelo teste T pareado, transformação logarítmica; razão de Q/Ti= 2,19, estando presente nos 10 géis das duas condições. A proteína Hsc70 (*70-kDa heat shock cognate protein 70*) foi classificada como de choque térmico (*heat shock*) devido à homologia com outras proteínas dessa família, como Hsp70. Hsc70 tem 85% de identidade com a proteína Hsp70 humana, entretanto apresentam funções distintas. A proteína Hsc70 é constitutivamente abundante e desempenha funções relacionadas com os processos celulares como catálise do desencapsulamento de clatrina dependente de ATP, correto enovelamento e estabilização de novas proteínas prevenindo agregação, degradação lisossômica de proteínas intracelulares comprometidas (GOLDFARB et al., 2006). Interage ainda com formas mutantes da proteína p53. As proteínas Hsp70 e Hsc70 apresentam abundância em neutrófilos nas condições de choque térmico por vias endolisossômicas envolvendo mecanismo sensível a ATP (BOYKO; SAPOZHNIKOV; KOVALENKO, 2012). Hsp70 e Hsc70 desempenham um papel na defesa celular contra a lise promovida pelo complemento, havendo a translocação de Hsc70 do citoplasma para a superfície de células leucêmicas K562 (*Human erythroleukemia K562 cells*) e auxiliam a direcionar proteínas produzidas no citossol para dentro de organelas como mitocôndria e núcleo (FISHELSON et al., 2001). Em neutrófilos e em outras células imunológicas, Hsc70 está associada a produção de citocinas e quimiocinas como TNF- α , IL-1 β , IL-6, mesmo na ausência de peptídeos antigênicos (ASEA et al., 2000). Por outro lado BAG1 exerce potente efeito antiapoptótico ao ligar-se a Bcl-2 e interagindo com o receptor de sinal de morte induzida por TNF tipo I. Os efeitos inibitórios do BAG-1 sobre a atividade de chaperona Hsp/Hsc70 indicam que BAG-1 representa um novo tipo de proteínas chaperonas reguladoras, sugerindo uma relação entre sinalização celular, morte celular e resposta ao estresse (TAKAYAMA et al., 1997). Houve diminuição na abundância dessa proteína na condição TiO₂ o que pode indicar participação de um lado de Hsc na produção de citocinas, o que foi demonstrado na ativação de neutrófilos por NPs de titânio por Gonçalves et al., (2010) e por outro a potencial

regulação por BAG1 no efeito antiapoptótico de neutrófilos pela interação com NPs de TiO₂ (100 µg/mL) ao longo de 24hs, o que foi mostrado pelos mesmos autores.

5.9.3- Proteína TRIO - proteína de ligação a F-actin

Trio é uma proteína multifuncional que pode servir para integrar e amplificar os sinais envolvidos na remodelação da actina, a migração celular e crescimento celular. Contém três domínios enzimáticos: dois domínios funcionais GEF (guanine nucleotide exchange factors) e um domínio proteína serina / treonina-cinase (PSK). Um dos domínios de GEF Trio (Trio GEF-D1) tem atividade específica de rac-GEF (regula microvilosidades da membrana), enquanto que o outro domínio de GEF Trio (Trio GEF-D2) tem atividade específica rho (polimerização da actina, reorganização do citoesqueleto e formação de contatos focais(filopódias/pseudopódias), (SEIPEL et al., 1999). Em neutrófilos a proteína Trio promove a migração transendotelial de leucócitos induzindo a formação de projeções circulares endoteliais que envolvem os PMNs, de forma dependente da proteína filamina com ativação de Rac1 e RhoG. Foi demonstrado que a abundância diminuída de Trio-GEF-D1 no endotélio, reduz a transmigração endotelial de neutrófilos (VAN RIJSSEL et al., 2012) e que a exocitose de grânulos primários de neutrófilos humanos é regulada por remodelação da actina dependente de Rac (MITCHELL et al., 2008). Neste estudo houve uma possível abundância diminuída da proteína Trio no *spot* 815 após a interação dos neutrófilos com TiO₂. Como o *spot* 815 apresenta as duas proteínas acima descritas, não foi possível, com os resultados atuais, definir qual (ou quais) se encontram de fato detectadas em menor quantidade nos géis. Pode-se afirmar apenas que pelo menos uma delas encontra-se em menor abundância, sendo necessários estudos mais detalhados para definição.

6. CONCLUSÕES

O presente estudo permitiu a análise da interação dos neutrófilos com NPs de TiO_2 , levando a algumas conclusões. As interações dos neutrófilos com as NPs de dióxido de titânio de 180nm promoveram ativação e marcantes alterações da morfologia celular (deformações celulares, citonemas, nanoporos, pseudópodes) ao longo do tempo analisado, com intensa produção de ânion superóxido e risco de citotoxicidade por estresse oxidativo. Os neutrófilos internalizaram NPs de TiO_2 por mecanismos distintos que envolveram fagocitose com emissão de pseudópodes e por um processo passivo a ser esclarecido, tendo sido as NPs detectadas nas células por análises de videomicroscopia, microscopias de luz, varredura, de transmissão e elementar por dispersão por raios-X.

O processo de quimiotaxia dos neutrófilos ocorreu de forma independente da opsonização das NPs de TiO_2 , demonstrando que esse metal é um potente quimiotático nos tempos analisados e estimula vias celulares independentes de mediadores plasmáticos ou celulares. A citometria de fluxo permitiu demonstrar que neutrófilos ativados com NPs de TiO_2 e quiescentes apresentaram valores equiparados de expressão dos receptores de adesão de membrana CD-62L e CD-11b indicando que a adesão e captação desse metal utiliza eletivamente outras vias metabólicas na interação com partículas nanoestruturadas (< 200 nm) no curso de tempo analisado.

As alterações nanomecânicas resultantes das interações das NPs de TiO_2 com neutrófilos ativados e fixados analisados por espectroscopia de força atômica demonstraram aumento da rigidez associado a alteração da morfologia celular. As células tratadas pelas nanopartículas metálicas demonstraram um aumento das forças atrativas em relação às células não tratadas. Esse evento foi observado principalmente nos tempos de exposição iniciais, provavelmente devido a interação com a membrana dos neutrófilos e fagocitose. Resultados semelhantes foram obtidos para as forças de adesão e energia dissipada. As células tratadas com NPs de TiO_2 apresentaram um comportamento de aumento da elasticidade ao longo do tempo.

Na análise proteômica, foram identificadas proteínas diferencialmente abundantes entre as condições e proteínas comuns aos dois estados. A proteína

MFA3L teve diminuição da abundância na condição TiO_2 (*spot* 724). Já as proteínas Hsc70/Bag1 e TRIO (*spot* 815) também foram detectadas como estando, pelo menos uma delas, em menor quantidade na condição TiO_2 . Tal fato pode estar relacionado com as alterações morfológicas descritas no presente trabalho, uma vez que se trata de proteínas envolvidas na organização do citoesqueleto, formação de fagossomos, pseudópodes e fagocitose.

As alterações celulares morfológicas, metabólicas e nanomecânicas observadas ao longo do tempo pela interação com as NPs de TiO_2 , estão intrinsicamente relacionadas à ativação, reorganização do citoesqueleto, e endocitose por fagocitose ou outros mecanismos de captação. Esse cenário com aumento na rigidez e modificações nas expressões protéicas sugere fortemente uma relação direta nas funções fisiológicas dos neutrófilos como rolamento, adesão e transmigração. Assim, a investigação dessas interações representa um passo fundamental para esclarecer os mecanismos envolvidos em tratamentos que contenham nanomateriais e a sua distribuição nos organismos.

7. PERSPECTIVAS

Além das características morfológicas, bioquímicas e mecânicas descritas e caracterizadas neste trabalho, os dados ora discutidos nos permitiram levantar novas questões a respeito do comportamento de neutrófilos frente à exposição a NPs de TiO₂. Dentre tais perspectivas estão:

A - Demonstrou-se no presente estudo que NPs de TiO₂ agem como quimiotáticos para neutrófilos, porém o mecanismo de tal quimiotaxia ainda não foi detalhado. Perguntas como : Seriam íons de Ti ou outros componentes os desencadeantes desse processo? A que distância as NPs de TiO₂ desencadeiam a quimiotaxia em neutrófilos? As NPs de TiO₂ seriam capazes de levar à diapedese? Poderiam ser respondidas por ensaios mais específicos de quimiotaxia, como os em câmara de Boyden, ou os de migração em gel.

B - O presente estudo não demonstrou significativamente a participação de CD11b e de CD62L nos mecanismos de interação de neutrófilos com NPs de TiO₂, restando ainda esclarecer quais moléculas de adesão estariam envolvidas nesse processo, já que a adesão às NPs foi também aqui definida. (Vide anexos B e C)

C - Continuidade da avaliação das amostras por análise proteômica visando a identificação das proteínas exclusivas de neutrófilos ativados por NPs de TiO₂, como, por exemplo, a definição de quais proteínas do spot 815 são, de fato, menos abundantes após a exposição às NPs.

D - Continuidade da análise dos mecanismos de captação das nanopartículas de TiO₂ pelos neutrófilos, visando caracterizar as diferentes vias metabólicas utilizadas (papel de Fc-gama-III e/ou do inflamossomo),

E - Análise por ICP-MS (Inductively Coupled Plasma-MS) dos extratos protéicos de neutrófilos expostos e não-expostos ao titânio, de forma a se caracterizar a presença de titânio na fração protéica do extrato celular,

F - Análise por ICP-MS de bandas eletroforéticas do extrato protéico, de forma a caracterizar as faixas de massa molecular que contêm proteínas ligadas a titânio.

G - Análise *in vivo* da interação das NPs de TiO₂.

8-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A-HASSAN, E. et al. Relative microelastic mapping of living cells by atomic force microscopy. **Biophys. J.**, v. 74, p. 1564–1578, 1998.

ABRAMS, W. et al. Molecular cloning of the microfibrillar protein MFAP3 and assignment of the gene to human chromosome 5q32–q33.2. **Genomics**, v. 26, n. 1, p. 47-54, 1995.

ALBELDA, S.; SMITH, C.; WARD, P. Adhesion molecules and inflammatory injury . **The FASEB Journal**, v. 8, p. 504-512, 1994.

ALBREKTSSON, T. The response of bone to titanium implants. **Crit.Rev. Biocompat.**, v. 1, p. 53-84, 1985.

ALESSANDRINI, A.; FACCI, P. AFM: a versatile tool in biophysics. **Meas. Sci.Technol.** , v. 16 p. 65–92, 2005.

ANANTHAKRISHNAN, R.; EHRLICHER, A. The Forces Behind Cell Movement. **International Journal of Biological Sciences**, v. 3, n. 5, p. 303-317, 2007.

ANDERSON, N.; MATHESON, A.; STEINER, S. Proteomics: applications in basic and applied biology. **Curr Opin Biotechnol.**, v. 11, n. 4, p. 408-12, 2000.

ANGUS, A. et al. Pseudomonas aeruginosa induces membrane blebs in epithelial cells, which are utilized as a niche for intracellular replication and motility. **Infect Immun** v. 76, p. 1992–2001, 2008.

APLIN, A. et al. Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: The role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. **Pharmacol Rev.**, v. 50, n. 2, p. 197-263, 1998.

AQUINO, E. Análise proteômica comparativa entre neutrófilos quiescentes e estimulados com fator de agregação plaquetária (PAF). p. 149 p., Março 2008.

ARORA, H. et al. Nanomaterials for the Life Sciences In: KUMAR, C. S. S. R. (Ed.). **Nanocomposites**. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, v.8:, 2010.

ASEA, A. et al. HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine **Nat Med**, v. 6, p. 435-442, 2000.

ASTM-F86-04. Standard Practice for Surface Preparation and Marking of metallic surgical Implants **American Society for Testing and Materials**, 2009.

BABIOR. The respiratory burst of phagocytes. **J Clin Invest.**, v. 73, p. 599-601, 1984.

_____. NADPH oxidase: an update. **Blood**, v. 93, p. 1464-76, 1999.

BABIYCHUK et al. Blebbing confers resistance against cell lysis. **Cell Death and Differentiation** v. 18, p. 80–89, 2011.

BABIYCHUK, E. et al. Intracellular Ca²⁺ operates a switch between repair and lysis of streptolysin O-perforated cells. **Cell Death Differ**, v. 16, p. 1126–1134, 2009.

BAEHNER, R.; NATHAN, D. Quantitative nitroblue tetrazolium test in chronic granulomatous disease. **New Engl.J.Med**, v. 278, p. 971, 1968.

BAETU, T., HISCOTT, J. On the TRAIL to apoptosis. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 13, p. 199-207, 2002.

BAGGE, U. Granulocyte rheology. **Blood Cells** v. 2, p. 481-490, 1976.

BAKER, V. et al. Cytokines-associated neutrophil extracellular traps and antinuclear antibodies in Plasmodium falciparum infected children under six year of age. **Malaria Journal** v. 7 n. 41, 2008.

BARBOSA, E.; SILVA L. P. Nanoscale characterization of synthetic polymeric porous membranes: Scrutinizing their stiffness, roughness, and chemical composition. **Journal of Membrane Science** v. 407–408 p. 128–135, 2012

BARILLET, S. et al. Toxicological consequences of TiO₂, SiC nanoparticles and multi-walled carbon nanotubes exposure in several mammalian cell types: an in vitro study. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 12, n. 1, p. 61-73, 2010.

BARTNECK et al. Phagocytosis independent extracellular nanoparticle clearance by human immune cells **Nano Letters**, v. 10, n. 1, p. 59–64, 2010.

BARTNECK, M. et al. Phagocytosis independent extracellular nanoparticle clearance by human immune cells **Nano Letters**, v. 10, n. 1, p. 59–64, 2010.

BASSO, C.; LAERUM, O.; SOLBERG, C. Phagocytosis of bacteria by human leucocytes measured by flow cytometry. **Proc. Soc. Exper. Biol. Med.**, v. 174, p. 182-186, 1983.

BELLER, D.; SPRINGER, T.; SCHREIBER, R. Anti-Mac-1 selectively inhibits the mouse and human type three complement receptor. **J. Exp. Med**, v. 156, p. 1000-1009, 1982.

BENITE, A.; MACHADO, S.; BARREIRO, E. Considerações sobre a Química Bioinorgânica Medicinal **Revista Eletrônica de Farmácia** v. 4, n. 2, p. 131-142, 2007.

BERARDINI, M.; ENGE, T.; BRENAN, J. Heterobimetallic platinum-titanium complexes: potential anticancer drugs. **Inorg. Chem**, v. 32 n. 12, p. 2724–2728, 1993.

BERKELMAN, T.; STENSTEDT, T. **2-D Electrophoresis-using immobilized pH gradients**. Principles and Methods. Uppsala, Sweden: Amersham Biosciences 100 p. 2001.

BERMUDEZ, E. et al. Pulmonary responses of mice, rats, and hamsters to subchronic inhalation of ultrafine titanium dioxide particles. **Toxicol Sci.**, v. 77, n. 2, p. 347-57, 2004

BERTHO, A. CITOMETRIA DE FLUXO. **CITOMETRIA DE FLUXO**, Rio de Janeiro, 2011. Acesso em: 20.05.2012. <http://picf.ioc.fiocruz.br/apostila.doc>.

BERTHO, A.; SANTIAGO, M.; COUTINHO, S. Flow Cytometry in the study of cell death. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, p. 429-433, 2000.

BEUTLER, B. Innate immunity: an overview. *Mol Immunol*40: 845-59, 2004.

. **Mol.Immunol**, v. 40, p. 845-59, 2004.

BHATTACHARYA, K. et al. Titanium dioxide nanoparticles induce oxidative stress and DNA-adduct formation but not DNA-breakage in human lung cells. **Part Fibre Toxicol** v. 21, p. 6-17, 2009.

BIER, O. **Microbiologia e Imunologia**. São Paulo: Melhoramentos., 1990. 1234p

BINNIG, G.; QUATE, C.; GERBER, C. Atomic force microscope. **Phys. Rev. Lett**, v. 56, p. 930–933, 1986.

BIRON, D., BRUN C., LEFEVRE T. et al. The pitfalls of proteomics experiments without the correct use of bioinformatics tools. **Proteomics**, v. 6, n. 20, p. 5577-5596, 2006.

BOSCHI, A. O Que é necessário para que um material possa ser considerado um biomaterial? In: SEMINÁRIO REGIONAL DE BIOMATERIAIS 1, 1996. Santa Catarina. Anais, Santa Catarina UDESC. p. 4 – 16.

BOTHE, R.; BEATON, B.; DAVENPORT, H. Reaction of bone to multiple metallic implants. **Surg. Gynecology Obstet.**, v. 71, p. 598-602, 1940

BOYKO, A.; SAPOZHNIKOV, A.; KOVALENKO, E. **Hsp70 and Hsc70 dynamics in human neutrophils under heat shock conditions**. European Congress of Immunology IMMUNOLOGY, B. S. F. Glasgow, Scotland: The European Federation of Immunology Societies, 2012.

BOZZOLA, J.; RUSSEL, L. **Electron microscopy: principles and techniques for biologists**. 2nd.ed. Sudbury: 1999.

BRADFORD, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAGA, P.; RICCI, D. **Atomic Force Microscopy: Biomedical Methods and Applications**. Totowa, NJ: Humana Press, 2003.

BRANEMARK, P.-I. Osseointegration and its experimental studies. **J Prosthetic Dentistry**, v. 50, p. 399-410, 1983.

BRINKMANN, V.; REICHARD, U.; GOOSMANN, C. Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. **Science**, v. 303 p. 1532-1535, 2004.

BROMAN, M., MEHTA D, MALIK AB. Cdc 42 regulates the restoration of endothelial adherens junctions and permeability. **Trends Cardiovasc. Med** v. 17, p. 151-6, 2007.

BROWN, E. et al. Methods for assessing DNA hybridization of peptide nucleic acid-titanium dioxide nanoconjugates. **Analytical Biochemistry**, v. 383 n. 2, p. 226–35, 2008.

BURG, N., PILLINGER H. The neutrophil: function and regulation in innate and humoral immunity. **Clin Immunol.**, v. 99, n. 1, p. 7-17, 2001.

BURGGRAAF, P. **Guidelines for Optical Microscopy", Semiconductor International**. p.54-62, 1985.

BUSCH, W. et al. Internalisation of engineered nanoparticles into mammalian cells in vitro: Influence of cell type and particle properties. **Journal of nanoparticle research** v. 13, n. 1, p. 293-310, 2011.

CAIRNS, D.A. Statistical issues in quality control of proteomic analyses: Good experimental design and planning. *Proteomics*, v. 11(6) p. 1037-1048, 2011.

CAMPOS, A. **Application of proteomics and cytomics in human neutrophils functional studies**. 2007. 120 p. (Dissertação de Mestrado). UNB, Brasília, 2007.

CAPPELLA, B.; DIETLER, G. Force-distance curves by atomic force microscopy. **Surface Science Reports**, v. 34 p. 1-104, 1999.

CAREY, S.; CHAREST, J.; KING, C. Forces During Cell Adhesion and Spreading: Implications for Cellular Homeostasis. **Stud. Mechanobiol. Tissue Eng. Biomater.** v. 4, p. 29-69, 2011.

CARNEIRO, V. et al. Effects of periodontal therapy on phagocytic activity of peripheral blood neutrophils - evidence for an extrinsic cellular defect. **Oral Health Prev Dent**, v. 10, n. 2, p. 195-203, 2012.

CARON, E.; HALL, A. Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases **Science** v. 282, p. 1717-1721, 1998.

CASE, C. et al. Wide spread dissemination of metal debris from implants. **J Bone Joint Surg Br**, v. 76, p. 701-712, 1994.

CASSATELLA. The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. **Immunol Today**, v. 16, p. 21-26, 1995.

CASSATELLA et al. Neutrophil-derived proteins: selling cytokines by the pound. **Adv Immunol**, v. 73, p. 369-509, 1999.

CASTRO, M. et al. Proteome analysis of resting human neutrophils. **Protein. Pept. Lett**, v. 13, n. 5, p. 481-7, 2006.

CHAPMAN, S. **Maintaining and Monitoring the Transmission Electron Microscope**. Oxford, Oxford University Press, 1986.

CHARRAS, G.T. A short history of blebbing. **J Microsc** v. 231, p. 466–478, 2008.

CHARRAS, G.T. et al. Life and times of a cellular bleb. **Biophys J**, v. 94, p. 1836–1853, 2008.

CHARRAS; PALUCH, E. Blebs lead the way: how to migrate without lamellipodia. **Nat Rev Mol Cell Biol** v. 9, p. 730–736, 2008.

CHEN, F. et al. In vitro e in vivo activation of polymorphonuclear leukocytes in response to particulate debris **J Biomed Mater Res**, v. 48, p. 904-912, 1999.

CHIEN, S. et al. **Viscoelastic properties of leukocytes in White Cell Mechanics**. New York: Alan R. Liss, 1984.

CHOUDHARY, S.; HABERSTROH, K.; WEBSTER, T. Enhanced Functions of Vascular Cells on Nanostructured Ti for Improved Stent Applications. **Tissue Engineering**, v. 13 n. 7, p. 1421-30, 2007.

CHRISTODOULOU, C. et al. Second-line chemotherapy in small cell lung cancer in a modified administration of topotecan combined with paclitaxel: a phase II study **Br. J. Cancer.**, v. 77, p. 2088, 1998.

CHURCH, L.; COOK, G.; PRIMER, M. inflammasomes and interleukin 1 in inflammatory disorders. *Nature Clinical Practice Rheumatology*, v. 4, p. 34-42, 2008.

CLARK, S. et al. Platelet Toll-Like Receptor-4 Activates Neutrophil Extracellular Traps to Ensnare bacteria in Endotoxemic and Septic blood. **Nature Medicine** v. 13, n. 4 p. 463-9, 2007.

COENE, W. et al. Phase retrieval through focus variation for ultra-resolution in field-emission transmission electron microscopy. **Phys. Rev. Lett.**, v. 69, p. 3743–3746, 1992.

COLVIN, V. The potential environmental impact of engineered nanomaterials. **Nat Biotechnol.** , v. 21, n. 10, p. 1166-70, 2003.

CONKLYN, M.; NEOTE, K.; SHOWELL, H. Chemokine-dependent upregulation of CD11b on specific leukocyte subpopulations in human whole blood: effect of anticoagulant on rantes and MIP-1 beta stimulation **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 8, p. 762-766, 1996.

CONOVER, W. J. **Practical nonparametric statistics**. New York: John Wiley and Sons, 1999.

COOKE, M. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. **THE FASEB JOURNAL**, v. 17, n. 10, p. 1195-1214, 2003.

CÔRTE-REAL, M. et al. Contributos da citologia analítica para estudos de biologia de leveduras. *Boletim de Biotecnologia*. v. 71, p. 19-33, 2002.

COSTA NETO, P. D. O. **Estatística**. São Paulo: Edgard Blücher, 1977. 264p.

COSTA, R.; CHINAGLIA, E. AFM - Análise de Materiais por Microscopia de Força Atômica. São Bernardo do Campo. Trabalho de iniciação científica 2010. <http://www.ebah.com.br/content/ABAAAei4QAD/afm-caracterizacao-materiais-por-microscopia-forca-atomica-por-rodrigo-pasiani-costa> Acesso em: 20.08.2012.

COX, G. IL-10 enhances resolution of pulmonary inflammation in vivo by promoting apoptosis of neutrophils. **Am J Physiol**, v. 271, p. L566–71, 1996.

DARZYNKIEWICZ, Z. et al. Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). **Cytometry** v. 27, p. 1-20, 1997.

DE SANTIS, G. Transfusão de granulócitos. **Medicina, Ribeirão Preto**, v. 32, p. 470-477, 1999.

, B.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. **Microscopia eletrônica de varredura : aplicações e preparação de amostras : materiais poliméricos, metálicos e semicondutores**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2007. 60p.

DENG, Z. et al. Differential plasma protein binding to metal oxide nanoparticles. **Nanotechnology** v. 20 p. 455101, 2009.

DICK, C. et al. The role of free radicals in the toxic and inflammatory effects of four different ultrafine particle types. **Inhal Toxicol** v. 15, p. 39-52, 2003.

DONACHIE, M. **Titanium: A Technical Guide**. Titanium: A Technical Guide. Metals Park Ohio: ASM International. 1988.

DUBANIEWICZ, A.; DUBANIEWICZ, A.; HOPPE, A. The spontaneous and stimulated nitroblue tetrazolium (NBT) tests in mononuclear cells of patients with tuberculosis. **Ann Acade Med Biaios** v. 49, p. 252–255, 2004.

DUNNE, J. et al. Control of leukocyte rolling velocity in TNF-alpha-induced inflammation by LFA-1 and Mac-1. **Blood**, v. 99, p. 336–341, 2002.

DUPUY, A.; CARON, E. Integrin-dependent phagocytosis – spreading from microadhesion to new concepts. **Journal of Cell Science** v. 121, p. 1773-1783 2008.

DURÁN, N.; MATTOSO, L. H.; DE MORAIS, P. C. **Nanotecnologia: introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação**, São Paulo: Artiber Editora, 2006, 200p.

DZHAGALOV, I.; JOHN, A. S.; HE, Y.-W. The antiapoptotic protein Mcl-1 is essential for the survival of neutrophils but not macrophages. **Blood**. v. 109 n. 4, p. 1620-1626, 2007.

EDWARDS, S. **Biochemistry and Physiology of the Neutrophil**. Liverpool: 2005. 320p. ISBN 9780521416986

ERIKSSON; NYGREN. Adhesion receptors of PMN granulocytes on titanium in contact with whole blood. **J.Lab Clin Med** v. 137, p. 56-63, 2001a.

_____. Polymorphonuclear leukocytes in coagulating whole blood recognize hydrophilic and hydrophobic titanium surfaces by different adhesion receptors and show different patterns of receptor expression. **J.Lab Clin Med**, v. 137, n. 4, p. 296-302, 2001b.

ERIKSSON, C.; LAUSMAA, J.; NYGREN, H. Interactions between human whole blood and modified TiO₂-surfaces: influence of surface topography and oxide thickness on leukocyte adhesion and activation. **Biomaterials**, v. 22, n. (14), p. 1987-96, 2001.

ETIENNE-MANNEVILLE, S. Cdc42-The centre of polarity. **J. Cell. Sci**, v. 117, p. 1291-300, 2004.

ETIENNE-MANNEVILLE, S., HALL A. Cdc42 regulates GSK-3 β and adenomatous polyposis coli to control cell polarity. **Nature Medicine**, v. 421, p. 753-6 2003.

FABRY, B. et al. Time scale and other invariants of integrative mechanical behavior in living cells. . **Phys. Rev. E.** , v. 68, p. 041914, 2003.

FAURSCHOU, M.; BORREGAARD, N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. **Microbes and Infection**,, v. 5, p. 1317-1327, 2003.

FAZANO, C. A. T. V. **A Prática Metalográfica**. São Paulo: Hemus Livraria Editora Ltda, 1980. 82

FERAH, G. et al. Evaluation of adhesion molecules CD64, CD11b and CD62L in neutrophils and monocytes of peripheral blood for early diagnosis of neonatal infection. **World J Pediatr**, v. 8, n. 1, p. 72-75, 2012.

FERREIRA, T.; LORENZI, T.; NETO, S. **hemoterapia: fundamentos de morfologia, fisiologia, patologia e clinica** São Paulo: Atheneu, 1996. 303p

FINCH, G. et al. In vitro interactions between pulmonary macrophages and respirable particles. **Environ Res** v. 44, n. 2, p. 241-253, 1987.

FINGER, E. et al. A differential role for cell shape in neutrophil tethering and rolling on endothelial selectins under flow. **J. Immunol Methods**, v. 157, p. 5085-5096, 1996.

FISHELSON, Z. et al. Contribution of heat shock proteins to cell protection from complement-mediated lysis. **International Immunology**, v. 13, n. 8, p. 983-991, 2001.

FOK, T. N. A.; TANG, J. **Imaging and Stiffness Probing of Neutrophil Using Atomic Force Microscope**. Department of Physics, The Chinese University of Hong Kong Physics Department, Brown University, Providence, RI. Hong Kong 2008

FOSSATI, G. et al. The mitochondrial network of human neutrophils: role in chemotaxis, phagocytosis, respiratory burst activation, and commitment to apoptosis **J Immunol Methods**, v. 170, p. 1964-1972, 2003.

FRISKEN, K. et al. A study of titanium release into body organs following the insertion of single threaded screw implants into the mandibles of sheep. **Australian Dental Journal**, v. 47, n. 3, p. 214-17, 2002.

FULWYLER, M. Electronic separation of biological cells by volume. **Science**, v. 150 n. (698), p. 910–911, 1965.

FURST A. Trace elements related to specific chronic diseases: cancer. **Geol. Soc. of Am. Memoir**, v. 123, p. 109-110, 1971.

FURST, A; HARO, R. survey of metal carcinogenesis. **Prog. Exp. Tumour Res**, v. 12, p. 102-133, 1969.

GABRILOVICH, D. **The neutrophils New Outlook for Old Cells**. Convent Garden, London: Imperial College Press, 2005.

GALKINA et al. Proteome analysis identified human neutrophil membrane tubulovesicular extensions (cytonemes, membrane tethers) as bactericide trafficking. **Biochim Biophys Acta** , v. 1820, n. 11, p. 1705-1714, 2012.

GALKINA et al. Nitric oxide-induced membrane tubulovesicular extensions (cytonemes) of human neutrophils catch and hold *Salmonella enterica* serovar Typhimurium at a distance from the cell surface. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 56, p. 162–171, 2009.

GALKINA; SUD'INA, G. F.; ULLRICH, V. Inhibition of Neutrophil Spreading during Adhesion to Fibronectin Reveals Formation of Long Tubulovesicular Cell Extensions (Cytonemes). **Experimental Cell Research** v. 266, p. 222–228, 2001.

GALKINA, S. et al. Scanning electron microscopy study of neutrophil membrane tubulovesicular extensions (cytonemes) and their role in anchoring, aggregation and

phagocytosis. The effect of nitric oxide. **Experimental Cell Research** v. 304 n. 2, p. 620-9, 2005.

GANE, J.; STOCKLEY, R. Mechanisms of neutrophil transmigration across the vascular endothelium in COPD. **Thorax**, May 4 2011. ISSN 1468-3296 (Electronic) 0040-6376 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21543441>

GAO, Y. et al. Proteomic analysis of early response lymph node proteins in mice treated with titanium dioxide nanoparticles. **Journal of Proteomics**, v. 74, p. 2745-2759, 2011.

GEISER, M. et al. Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells. **Environmental Health Perspectives**, v. 113 n. 11, p. 1555–60, 2005

GHESLAGHI, Z. et al. Toxicity and interaction of titanium dioxide nanoparticles with microtubule protein. **Acta Biochim Biophys**, v. 40, n. 9, p. 777-782, 2008.

GIESSIBL, F. Advances in atomic force microscopy. **Reviews of Modern Physics** v. 75 n. 3, p. 949-983, 2003.

GILMORE. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. **Oncogene**, v. 25, p. 6680–6684, 2006.

GLAESER, R. Cryo-electron microscopy of biological nanostructures. **Physics Today**, v. 61, n. 1, p. 48, 2008.

GOLDFARB, S. et al. Differential effects of Hsc70 and Hsp70 on the intracellular trafficking and functional expression of epithelial sodium channels. **Proc Natl Acad Sci USA**. v. 103, n. 15, p. 5817–5822, 2006.

GOLDSBY, R.; KINDT, T.; OSBORNE, B. **Kuby Immunology**. 4ed. 2002.

GOLDSTEIN, J. et al. **Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis**. New York: Plenum Press. 1992.

GOLDSTEIN, J. et al. **Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis: A text for Biologists, Materials Scientists and Geologists**. 2a Ed. Plenum Publishing Corporation, 1992.

GONÇALVES; CHIASSON, S.; GIRARD, D. Activation of human neutrophils by titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles. **Toxicol In Vitro**, v. 24 n. 3, p. 1002-8, 2010.

GONÇALVES; GIRARD, D. Titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles induce neutrophil influx and local production of several pro-inflammatory mediators in vivo. **Int Immunopharmacol**, v. 11, n. 8, p. 1109-15. 2011

GONÇALVES; LIZ, R. D.; GIRARD, D. Activation of Neutrophils by Nanoparticles- Review article **The Scientific World Journal**. v. 11, p. 1877–1885 2011.

GRASSIAN, V. et al. Inflammatory response of mice to manufactured titanium dioxide nanoparticles: comparison of size effects through different exposure routes. **Nanotoxicology** v. 1, n. 3, p. 211–226, 2007.

GRATTON, S., ROPP PA, POHLHAUS PD, LUFT JC, MADDEN VJ, NAPIER ME, DESIMONE JM The effect of particle design on cellular internalization pathways. **Proc Natl Acad Sci USA** v. 105, p. 11613–11618, 2008

GRINNELL, F. Migration Of Human Neutrophils In Hydrated Collagen Lattices. **Cell Sci.**, v. 58, p. 95-108, 1982.

GUDURU, R. **In situ AFM Imaging of Nanoparticle- Cellular Membrane Interaction for a Drug Delivery Study**". 422, P. FIU Electronic Theses and Dissertations. 2011.

HACKENBERG, S. et al. Intracellular distribution, geno and cytotoxic effects of nanosized titanium dioxide particles in the anatase crystal phase on human nasal mucosa cells. **Toxicol Lett** v. 195, p. 9-14, 2010.

HAIDER, M. et al. "Towards 0.1 nm resolution with the first spherically corrected transmission electron microscope". **Journal of Electron Microscopy** v. 47, p. 395, 1998.

HAIMOVICH, B. et al. Tyrosine phosphorylation and cytoskeletal reorganization in platelets are triggered by interaction of integrin receptors with their immobilized ligands. **J Biol Chem** v. 268, p. 15868-77, 1993.

HALL, W. et al. Single Nanoparticle Spectroscopy: An Analysis of Sample Preparation and Microscopy Techniques. **nanoscape** v. 2, n. 1, p. 35-41, 2005.

HAMILTON, R. et al. Particle length-dependent titanium dioxide nanomaterials toxicity and bioactivity. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 6, n. 35, p. 1-11, 2009.

HAN, W.; SERRY, F. Force Spectroscopy with the Atomic Force Microscope.
. **Force Spectroscopy** Printed in USA, 2008.

HARAGUSHI, H. Metallomics as integrated biometal science. **J.Anal.At.Spectrom**,
v. 19, p. 5-14, 2004.

HASEGAWA, T.; INAGAKI, K.; HARAGUCHI, H. Multielement Correlation Analysis of
Major-to-Trace Elements in Human Blood Serum for Medical Diagnosis as Studied
by ICP-AES and ICP-MS **Analytical Sciences**, v. 17 n. Supplement i979, 2001.

HAYDEN; GHOSH, S. Signaling to NF-kappaB. **Genes Dev**, v. 18, p. 2195–2204,
2004.

HE, J.; XU, W.; ZHU, L. Analytical model for extracting mechanical properties of a
single cell in a tapered micropipette. **Appl Phys Lett**, v. 90, n. 2, p. 023901, 2007.

HEASMAN, S., RIDLEY A.J. Mammalian Rho GTPases: new insights into their
functions from in vivo studies. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** **2008; 9:690-701** v. 9 p. 690-
701, 2008.

HEDENBORG, M. Titanium dioxide induced chemiluminescence of human
polymorphonuclear leukocytes. **International Archives of Occupational and
Environmental Health** v. 61, p. 1–6, 1988.

HERANT, M.; HEINRICH, V.; DEMBO, M. Mechanics of neutrophil phagocytosis:
behavior of the cortical tension. **J Cell Sci.** , v. 1, n. 118(Pt 9), p. 1789-97, 2005

HERBERT, B. Advances in protein solubilisation for two-dimensional electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 20, p. 660-663, 1999.

HOCHMUTH, R. Micropipette aspiration of living cells **J Biomech**, v. 33, n. 1, p. 15-22, 2000.

HOFFMANN, P. et al. Energy Dissipation in Atomic Force Microscopy and Atomic Loss Processes. **Physical Review Letters** v. 87, n. 26, p. 1-4, 2001.

HOHR, D. et al. The surface area rather than the surface coating determines the acute inflammatory response after instillation of fine and ultrafine TiO₂ in the rat. **Int J Hyg EnvironHealth** v. 205, p. 239-244, 2002.

HONG, S. et al. Interaction of poly (amidoamine) dendrimers with supported lipid bilayers and cells: hole formation and the relation to transport. **Bioconjugate chemistry** v. 15, n. 4, p. 774-782, 2004.

HUANG, Y.; WU, C.; RS, A. Toxicity of Transition Metal Oxide Nanoparticles: Recent Insights from in vitro Studies. **Materials** v. 3, p. 4842-4859, 2010. ISSN ISSN 1996-1944.

HUSSAIN, S. et al. Oxidative stress and proinflammatory effects of carbon black and titanium dioxide nanoparticles: role of particle surface area and internalized amount. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 260, p. 142-149, 2009.

HUSSAIN, S. et al. Carbon black and titanium dioxide nanoparticles elicit distinct apoptotic pathways in bronchialepithelial cells. **Particle and Fibre Toxicology** v. 7, n. 10, p. 1-17, 2010.

IARC. **Titanium dioxide group 2B,**” IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, . Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. 9p, 2006.

_____. **Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans.** . IARC. Lyon, France,: International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. 93p, 2010.

IAVICOLI, I.; VERUSCKA, L.; BERGAMASCHI, A. Toxicological Effects of Titanium Dioxide Nanoparticles: A Review of In Vivo Studies. **Journal of Nanomaterials** v. 2012, article ID 964381. 36p , 2012.

IVERSEN, T-G; SKOTLANDA, T; SANDVIG K. Endocytosis and intracellular transport of nanoparticles: Present knowledge and need for future studies. *Nanotoday*, v.6 p. 176-185, 2011.

JACOBS, J. et al. Release and excretion of metal in patients who have total hipreplacement component made of titanium-base alloy. **J Bone Joint Surg Br**, v. 73, n. A, p. 1475-1486, 1991.

JANEWAY, C.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. **Imunobiologia: O Sistema Imune na Saúde e na Doença.** 4a Edição. Porto Alegre: ArtMed, 2000.

JENA, B. Discovery of the porosome: revealing the molecular mechanism of secretion and membrane fusion in cells. **J Cell Mol Med**, v. 8, p. 1–21, 2004.

JIANG, J.; OBERDORSTER, G.; BISWAS, P. Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 11, p. 77-89, 2008.

JOHNSTON, H. et al. Identification of the mechanisms that drive the toxicity of TiO₂ particulates: the contribution of physicochemical characteristics **Particle and Fibre Toxicology**, v. 6, n. 33, p. 1-27, 2009.

JONES; GRAINGER, D. In vitro assessments of nanomaterial toxicity. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, p. 438-456, 2009.

JONES, B. et al. Cleavage of Peptides and Proteins Using Light-Generated Radicals from Titanium Dioxide. **Anal. Chem**, v. 79 n. 4, p. 1327–1332, 2007.

JORGENSON et al. Biologic response to passive dissolution of titanium craniofacial microplates. **Biomaterials**, v. 20 p. 675-682, 1999.

JORGENSON et al. Detection of titanium in human tissues after craniofacial surgery. **Plast Reconstr. Surg**, v. 99, p. 976-79, 1997.

JOVANOVIĆ, B. et al. Effects of nanosized titanium dioxide on innate immune system of fathead minnow (*Pimephales promelas* Rafinesque, 1820). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 4, p. 675–683, 2011.

JUNQUEIRA, J., CARNEIRO, J. **Biologia Celular e Molecular**. 8a. Rio de Janeiro Guanabara Koogan, 2005.

KANG, I. **CHANGES IN THE BIOMECHANICAL PROPERTIES OF ENDOTHELIAL CELLS DURING NEUTROPHIL ADHESION AND MIGRATION**. 2006. 207p (PhD). Department of Biomedical Engineering, Case Western Reserve University.

KANG, S. et al. Titanium dioxide nanoparticles trigger p53-mediated damage response in peripheral blood lymphocytes. **Environ Mol Mutagen** v. 49, p. 399-405, 2008a.

_____. Titanium dioxide nanoparticles trigger p53-mediated damage response in peripheral blood lymphocytes. **Environ Mol Mutagen.**, v. 49, n. 5, p. 399-405, 2008b.

KANG, S. et al. Titanium dioxide nanoparticles induce apoptosis through the JNK/p38-caspase-8-Bid pathway in phytohemagglutinin-stimulated human lymphocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications** v. 386 p. 682–687, 2009.

KARLSSON, H. et al. Size-dependent toxicity of metal oxide particles – a comparison between nano- and micrometer size. **Toxicology Letters**, v. 188 n. 2, p. 112–18, 2009.

KARNOVSKY, M. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology** v. 27, p. 137A, 1965.

KASSAMBARA, A. et al. Identification of Pluripotent and Adult Stem Cell Genes Unrelated to Cell Cycle and Associated with Poor Prognosis in Multiple Myeloma. **PLoS ONE** v. 7, n. 7, p. e42161, 1-9, 2012.

KASTENMAYER, P. Análisis de minerales y elementos traza en alimentos. In: (Ed.). **Nielsen-Introduction to the chemical analysis of foods**, (271-294), 1994.

KELLER; EGGLI, P. Protrusive activity, cytoplasmic compartmentalization, and restriction rings in locomoting blebbing Walker carcinosarcoma cells are related to

detachment of cortical actin from the plasma membrane. **Cell Motil Cytoskeleton** v. 41, p. 181–193, 1998.

KENDALL, K. "Adhesion: Molecules and Mechanics". **Science** v. 263 n. (5154), p. 1720–5., 1994.

KERR, J.; WYLLIE, A.; CURRIE, A. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br. J. Cancer**, v. 26, n. 4, p. 239–57, 1972.

KIRCHNER, C. et al. Cytotoxicity of colloidal CdSe and CdSe/ZnS nanoparticles. **Nano Letters** v. 5, n. 2, p. 331-338, 2005.

KLINKMANN, H.; WOLF, H.; SCHMITT, E. Definition of biocompatibility. **Contributions in Nephrology** v. 37, p. 70-77, 1984.

KNOLL, M. Aufladepotential und Sekundäremission elektronenbestrahlter Körper. **Zeitschrift für technische Physik** v. 16 p. 467–475, 1935.

KOOPMAN, G. et al. Annexin V for Flow Cytometric Detection of Phosphatidylserine Expression on B Cells Undergoing Apoptosis. **Blood**, v. 84, n. 5, p. 1415-1420, 1994.

KOPF-MAIER, P.; HESSE, B.; KOPF, H. Tumor inhibition by metallocenes: effect of titanocene and hafnocene dichlorides on Ehrlich ascites tumor in mice. **J. Cancer Res. Clin. Oncol**, v. 96, n. 1 p. 43-51, 1980.

KOPF-MAIER, P. et al. Tumor inhibition by metallocenes: antitumor activity of titanocene dihalides (C₅H₅)₂TiX₂ (X=F, Cl, Br, I, NCS) and their application in buffered solutions as a method for suppressing drug-induced side effects. **J. Cancer. Res. Clin. Oncol**, v. 97, n. 1, p. 31-39, 1980.

KOPF-MAIER, P.; KRAHL, D. Intracellular distribution of titanium after treatment with the antitumor agent titanocene dichloride: an electron energy loss spectroscopic study **Naturwissenschaft**, v. 68, n. 5, p. 273-274, 1981.

KROEMER, G. Introduction: mitochondrial control of apoptosis. . **Biochimie.**, v. 84, p. 103-104, 2002.

KUIJPERS, T.; ROOS, D. **Neutrophils. Encyclopedia of life sciences.** Amsterdam, Netherlands: John Wiley & Sons, Ltd, 2001.

KUMAR, C. S. R. **Nanocomposites** Weinheim, Germany: John Wiley & Sons, 2010 466p.

KUMARATHASAN, P. et al. An optimized protein in-gel digest method for reliable proteome characterization by MALDI–TOF–MS analysis. v. 346, p. 85–89, 2005.

KUMAZAWA, R. et al. Effects of Ti ions and particles on neutrophil function and Morphology. . **Biomaterials**, v. 23, p. 3757–3764, 2002.

KUZNETSOVA, T. et al. Atomic force microscopy probing of cell elasticity. **Micron**, v. 38, n. 8, p. 824-33, 2007.

LAI, T.; LEE, W. Killing of cancer cell line by photoexcitation of folic acid-modified titaniumdioxide nanoparticles. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry** v. 204 p. 148–153, 2009.

LANGFORD, R.; FRAME, J. Surface analysis of titanium maxillofacial plates and screws retrieved from patients. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 31, n. 5, p. 511-8, 2002.

LANNAN, S. et al. Changes in neutrophil morphology and morphometry following exposure to cigarette smoke. **Int. J. Exp. Path.**, v. 73, p. 183-191, 1992.

LARSEN et al. Phospho-proteomics: Evaluation of the use of enzymatic de-phosphorylation and differential mass spectrometric peptide mass mapping for site specific phosphorylation assignment in proteins separated by gel electrophoresis. . **Proteomics** v. 1, p. 223–238, 2001.

LARSEN, M. et al. Highly selective enrichment of phosphorylated peptides using titanium dioxide. **NatureProtocols**, v. 1, p. 1929-1935, 2006.

LATIFYNIA, A. et al. NEUTROPHIL FUNCTION (INNATE IMMUNITY) DURING RAMADAN. **J Ayub Med Coll Abbottabad** v. 21, n. 4, p. 111-115, 2009.

LEE, W., HARRISON RE, GRINSTEIN S. Phagocytosis by neutrophils. **Microbes Infect**, v. 5, n. 14, p. 1299-1306, 2003.

LEE, Y.; PATEL, D.; PARK, S. Local rheology of human neutrophils investigated using atomic force microscopy. **Int J Biol Sci.**, v. 7, n. 1, p. 102-11, 2011

LEIST, M.; JAATTELA, M. Triggering of apoptosis by cathepsins. **Cell Death Differ**, v. 8, p. 324-326, 2001.

LI, N. et al. Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. **Environ Health Perspect** v. 111, p. 455–460, 2003.

LINNAINMAA, K.; KIVIPENSAS, P.; VAINIO, H. Toxicity and cytogenetic studies of ultrafine titanium dioxide in cultured rat liver epithelial cells. **Toxicol in vitro** v. 11, p. 329-335, 1997.

LOKUTA, M.; NUZZI, P. A.; HUTTENLOCHER, A. Calpain regulates neutrophil chemotaxis. **PNAS** v. 100 n. 7, p. 4006–4011, 2003.

LOMINADZE, G. et al. Proteomic Analysis of Human Neutrophil Granules. **Molecular & Cellular Proteomics** v. 4, p. 1503-1521, 2005.

LUSCINSKAS, F. et al. In vitro inhibitory effect of IL-8 and other chemoattractants on neutrophil-endothelial adhesive interactions. **J Immunol.**, v. 149, n. 6, p. 2163-2171, 1992.

MACHADO, A. et al. Identificação de isoformas miosínicas estruturais de músculo gastrocnêmio de ratos treinados e sedentários em gel bidimensional. **R. Bras. Ci. e Mov.** v. 18, n. 2, p. 26-34, 2010.

MADDIGAN, B. **Development of a model to explain the effect of variable membrane compliance on single molecule adhesive bond force.** 2004. (Bachelor of Science). Massachusetts Institute of technology Massachusetts, USA.

MARTIN, Y.; WILLIAMS, C.; WICKRAMASINGHE, H. Atomic force microscope-force mapping and profiling on a sub 100-Å scale. **J.Appl. Phys.**, v. 61 p. 4723-4729, 1987

MATHUR,A.; TRUSKEY, G.; REICHERT, W. Atomic force and total internal reflection fluorescence microscopy for the study of force transmission in endothelial cells. . **Biophys J**, v. 78, p. 1725-1735, 2000.

MAYER, B.; OBERBAUER, R. Mitochondrial regulation of apoptosis. **News Physiol v. Sci**18, p. 89-94, 2003

MCCORMICK, A. et al. NETs formed by human neutrophils inhibit growth of the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. **Microbes and Infection**, v. 12, p. 928-936, 2010.

MECKE, A. et al. Direct observation of lipid bilayer disruption by poly (amidoamine) dendrimers. **Chemistry and physics of lipids** v. 132, n. 1, p. 3-14, 2004.

MITCHELL, T. et al. Primary granule exocytosis in human neutrophils is regulated by Rac-dependent actin remodeling. **Am J Physiol Cell Physiol** v. 295, n. C, p. 1354 – C1365, 2008.

MOHAN, M. et al. Synthesi. Characterization and Antitumor Properties of Some Metal Complexes of 3- and 5-Substituted Salicylaldehyde 2-Pyridinylhydrazones. **J. Inorg. Biochem**, v. 31, p. 7, 1987.

MOISAN, E.; KOUASSI, E.; GIRARD, D. Mechanisms involved in methylmercuric chloride (MeHgCl)-induced suppression of human neutrophil apoptosis. **Hum Exp Toxicol** v. 22 n. 12 p. 629-637, 2003.

MOLLINEDO, F. Human neutrophil granules and exocytosis molecular control. **Inmunología**, v. 22 n. 4, p. 340-358, 2003

MUNIZ-JUNQUEIRA, M. et al. Acute and chronic influence of hemodialysis according to the membrane used on phagocytic function of neutrophils and monocytes and pro-inflammatory cytokines production in chronic renal failure patients. **Life Sciences**, v. 77, n. 25, p. 3141-3155, 2005.

MUNIZ-JUNQUEIRA, M. et al. Digitalis inhibits and furosemide does not change the in vitro phagocytic function of neutrophils of healthy subjects. **International Immunopharmacology** v. 3 p. 1439–1445, 2003.

NAKAGAWA et al. The photogenotoxicity of titanium dioxide particles. **Mutat Res**, v. 394, p. 125-132, 1997.

NEELI, I. et al. Regulation of extracellular chromatin release from neutrophils. **J Innate Immun** v. 1, p. 194-201, 2009.

NEELI, I.; RADIC, M. Knotting the NETs: Analyzing histone modifications in neutrophil extracellular traps Indira. **Arthritis Research & Therapy**, v. 14, p. 115, 2012.

NEL, A. et al. Toxic potential of materials at the nanolevel. **Science**, v. 311, n. 5761, p. 622-7, 2006.

NEUMANN, T. **Determining the elastic modulus of biological samples using atomic force microscopy**. JPK instruments, 2009.

NEVES, A. **Análise proteômica comparativa entre neutrófilos quiescentes e neutrófilos ativado por n-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fmlp)**. 2010. 158p. (Mestrado). Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília.

NORDENRAM, A.; KJELLMAN, O. Metal release from plates used in jaw fracture. **Int J Oral Maxillofac**, v. 18, p. 311-314, 1989.

NUEVO-ORDOÑEZ, Y. et al. Titanium preferential binding sites in human serum transferrin at physiological concentrations. **Metallomics**, v. 12, n. 31, p. 297-303, 2011.

NYGREN, H.; ERICKSSON, C.; LAUSMAA, J. Adhesion and activation of platelets and PMNLs at two different TiO₂ surfaces **J. Lab. Clin. Med**, v. 129, p. 35-46, 1997.

OAKES, P., PATEL DC, MORIN NA, ZITTERBART DP, FABRY B, REICHNER JS, TANG JX Neutrophil morphology and migration are affected by substrate elasticity. **Blood**, v. 114, n. 7, p. 1387-95, 2009.

OBERDÖRSTER, G. Pulmonary effects of inhaled ultrafine particles. **Int Arch Occup Environ Health**, v. 74, p. 1-8, 2001.

OBERDÖRSTER, G.; COX, C.; GELEIN, R. Intratracheal instillation versus intratracheal-inhalation of tracer particles for measuring lung clearance function. **Exp Lung Res**, v. 23, p. 17– 34, 1997.

OHASHI, T. et al. Experimental and numerical analyses of local mechanical properties measured by atomic force microscopy for sheared endothelial cells. **BioMed. Mater. Eng.**, v. 12 p. 319–327, 2002.

OKUDA-SHIMAZAKI, J. et al. Effects of titanium dioxide nanoparticle aggregate size on gene expression. **Int J Mol Sci.**, v. 11, n. (6), p. 2383-92, 2010.

OOSTHUIZENA, M. et al. Evaluation of the morphological changes in the lungs of BALB/c mice after inhalation of spherical and rod-shaped titanium nanoparticles. **Micron**, v. 43, n. 8, p. 863–869, 2012.

OPPENHEIM, J.; SHEVACH, E. **Immunophysiology. The role of Cells and Cytokines in Immunity and Inflammation**. New York: Oxford University Press, 1990.

OWEN, R. **A practical guide to AFM force spectroscopy and data analysis**^[OBJ]. JPK Instruments AG, p.8. 2006

PAN et al. Adverse Effects of Titanium Dioxide Nanoparticles on Human Dermal Fibroblasts and How to Protect Cells. **SMALL**, v. 5, n. 4, p. 511-520, 2009.

PANTÉ, N.; KANN, M. Nuclear pore complex is able to transport macromolecules with diameters of ~ 39 nm **Mol Biol Cell**, v. 13, p. 425–434, 2002.

PARHAM, P. **O sistema imune**. Porto Alegre, : Artmed 2001. 372p.

PARKER; FEIL, S. Pore-forming protein toxins: from structure to function. **Prog Biophys Mol Biol** v. 88, p. 91-142, 2005.

PAROLIN, M.; REASON, I. APOPTOSE COMO MECANISMO DE LESÃO NAS DOENÇAS HEPATOBILIARES. **Arq. Gastroenterologia** v. 38, n. 2, p. 138-144, 2001.

PEREIRA, J. **Estudo do Comportamento de nanopartículas de Dióxido de Titânio em diferentes suspensões**. 2010. 94, Universidade de Lisboa, Lisboa.

PETERSEN, E.; NELSON, B. Mechanisms and measurements of nanomaterial-induced oxidative damage to DNA. **ANALYTICAL AND BIOANALYTICAL CHEMISTRY**, v. 398, n. 2, p. 613-650, 2010.

PETRILLI, V.; MARTINON, F. The inflammasome, autoinflammatory diseases and gout **Joint Bone Spine** v. 74, p. 571-576, 2007.

PHILLIPS, L.; BARBANO, D. The Influence of Fat Substitutes Based on Protein and Titanium Dioxide on the Sensory Properties of Low fat Milk. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 11, p. 2726, 1997.

PICHERT, A. et al. Early Events in Apoptosis Induction in Polymorphonuclear Leukocytes. In: SCHMID, I. (Ed.). **Flow Cytometry – Recent Perspectives**: InTech, 2012. cap. 18, p.357-372.

PINDJAKOVA, J.; GRIFFIN, M. D. Defective neutrophil rolling and transmigration in acute uremia. **Kidney International** v. 80, n. 1, p. 447-450, 2011.

PINTO, A. et al. Prova Material. **Revista Científica do DPT da SSP da Bahia**, v. 2, n. 6, p. 7-11, 2005.

PUJALTÉ, I. et al. Cytotoxicity and oxidative stress induced by different metallic nanoparticles on human kidney cells. **Part Fibre Toxicol**, v. 8, n. 10, p. 1-16, 2011.

RAHMAN, Q. et al. Evidence that ultrafine titanium dioxide induces micronuclei and apoptosis in Syrian hamster embryo fibroblasts. **Environ Health Perspect** v. 110, p. 797-800, 2002.

RAMAGLI, L.; RODRIGUEZ, L. Quantitation of microgram amounts of protein in two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis sample buffer. **Electrophoresis**, v. 6, p. 559-563, 1985.

RANA, S. Metals and apoptosis: Recent developments. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology** v. 22 p. 262–284, 2008.

REDDY, K.; NABHA, S. M.; ATANASKOVA, N. Role of MAP kinase in tumor progression and invasion, . **Cancer Metastasis Rev.** , v. 22 p. 395–403, 2003.

REHN, B. et al. Investigations on the inflammatory and genotoxic lung effects of two types of titanium dioxide: untreated and surface treated. **TAAP** v. 189, p. 84-95, 2003.

REN, Q.; CHEN, K.; PAULSEN, I. T. Transport DB: a comprehensive database resource for cytoplasmic membrane transport systems and outer membrane channels. **Nucleic Acids Res** v. 35 p. D274–D279, 2007.

REN, Y., STUART L, LINDBERG F.P., ROSENKRANZAR, CHENY. Nonphlogistic clearance of late apoptotic neutrophils by macrophages: efficient phagocytosis independent of beta 2 integrins. **J. Immunol**, v. 166, p. 4743-4750, 2001

RICHARDSON, D. Iron Chelators as Therapeutic Agents for the Treatment of Cancer. **Crit. Rev. Oncol. Hematol**, v. 42, p. 267, 2002.

ROBINSON, J., BADWEY JA, KARNOVSKY ML, KARNOVSKY MJ Release of superoxide and change in morphology by neutrophils in response to phorbol esters: antagonism by inhibitors of calcium-binding proteins. **J Cell Biol**, v. 101, n. 3, p. 1052-8, 1985.

ROCA-CUSACHS, P. et al. Neutrophil microrheology probed by Atomic Force Microscopy. **The FASEB Journal** v. 20, n. A, p. 1296, 2006.

ROCA-CUSACHS, P. et al. Rheology of Passive and Adhesion-Activated Neutrophils Probed by Atomic Force Microscopy. **Biophys J.**, v. 91, n. 9 p. 3508–3518, 2006.

RODRIGUEZ, D. et al. Titanium levels in rats implanted with Ti 6Al4V treated samples in the absence of wear. **J Mater Sci Mater Med** v. 10, p. 847–851, 1999.

ROEPSTORFF, P. Mass spectrometry in protein studies from genome to function. **Current Opinion in Biotechnology** v. 8, p. 6-13, 1997.

ROOTS, R.; METCALF, J. H₂O₂ release from human granulocytes during phagocytosis: relationship to superoxide anion formation and cellular catabolism of H₂O₂. **J. Clin. Invest**, v. 60, p. 1266, 1977.

ROSENBERG, A.; GRÄTZ, K.; SAILER H.F. Should titanium miniplates be removed after bone healing is complete? **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 22, n. 3 p. 185–188, 1993.

ROSENBLUTH, M.; LAM, W.; FLETCHER, D. Force microscopy of nonadherent cells: a comparison of leukemia cell deformability. **Biophys J.**, v. 90, n. (8), p. 2994-3003, 2006.

ROTHER, G. et al. Flow cytometric measurement of the respiratory burst activity of phagocytes using dihydrorhodamine 123. **J. Immunol. Methods** v. 138, p. 133, 1991.

RUSSELL, S.; DAGHLIAN, C. Scanning electron microscopic observations on deembedded biological tissue sections: Comparison of different fixatives and embedding materials. **Journal of Electron Microscopy Technique** v. 2, n. 5, p. 489–495, 1985.

SABRI, S. et al. Glycocalyx modulation is a physiological means of regulating cell adhesion. **Journal of Cell Science** v. 113, p. 1589-1600, 2000.

SABROE, I. et al. Toll- like receptor (TLR)2 and TLR4 in human peripheral blood granulocytes: a critical role for monocytes in leukocyte lipopolysaccharide responses. **J Immunol Methods**, v. 168, p. 4701-4710, 2002.

SAGER, T.; KOMMINENI, C.; CASTRANOVA, V. Pulmonary response to intratracheal instillation of ultrafine versus fine titanium dioxide: role of particle surface area. **Part. Fibre Toxicol**, v. 5, p. 17-32, 2008.

SAITO, N. et al. Morphological heterogeneity of myeloperoxidase-positive granules in normal circulating neutrophils: an ultrastructural study by cryosection. **Histol. Histopathol**, v. 13, n. 2, p. 405-14, 1998.

SANTOS, K. **Análise Proteômica de neutrófilos normais e neutrófilos ativado com PMA, um análogo do Diacilglicerol**. 2007. 108p. Dissertação de Mestrado (Master). UNB, Brasília.

SARMIENTO-GONZALES, A. et al. Titanium levels in the organs and blood of rats with a titanium implant, in the absence of wear as determined by double-focusing ICP-MS. **Anal Bioanal Chem.**, v. 393, p. 335–343, 2009.

SAYES, C. et al. Correlating nanoscale titania structure with toxicity: a cytotoxicity and inflammatory response study with human dermal fibroblasts and human lung epithelial cells. **Toxicol.Sci**, v. 92, p. 174-185, 2006.

SCALES, J. Black staining around titanium alloy prostheses an orthopaedic enigma **J Bone Joint Surg Br**, v. 73, p. 534-536, 1991.

SCHAFF, U. et al. Calcium Flux in Neutrophils Synchronizes $\beta 2$ Integrin Adhesive and Signaling Events that Guide Inflammatory Recruitment. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 36, n. 4, p. 632-646, 2008.

SCHERBART, A. et al. Contrasting macrophage activation by fine and ultrafine titanium dioxide particles is associated with different uptake mechanisms. **Particle and Fibre Toxicology** v. 8, n. 31, p. 1-19, 2011a.

_____. Contrasting macrophage activation by fine and ultrafine titanium dioxide particles is associated with different uptake mechanisms. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 8, n. 31, p. 1-19, 2011b.

SCHORR, W. et al. Mechanisms of IL-8-induced Ca^{2+} signaling in human neutrophil granulocytes. **Eur. J. Immunol**, v. 29, p. 897–904, 1999.

SCHRAND, A. et al. Metal-based nanoparticles and their toxicity assessment. **Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol** v. 2, n. 5, p. 544-568, 2010.

SCHROEDER, H.; BALASSA, J.J.; TIPTON, I.H. Abnormal trace metals in man: titanium. **J. Chron. Dis**, v. 16, p. 55-69, 1963.

SCHWEISER, A. et al. Ten-year follow-up of primary straight-stem prosthesis (MEM) made of titanium or cobalt chromium alloy. **Arch Orthop Trauma Surg**, v. 123, n. 7, p. 353-6, 2003.

SCOWN, T. **Uptake and Effects of Nanoparticles in Fish**. 2009. University of Birmingham, UK.

SEGAL, AW. How neutrophils kill microbes. **Annu Rev Immunol**, v. 23, p. 197-223, 2005.

SEGAL; ABO, A. The biochemical basis of the NADPH oxidase of phagocytes. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 18, n. 2, p. 43-47, 1993.

SEGAL, A.; LEVI, A. CELL DAMAGE AND DYE REDUCTION IN THE QUANTITATIVE NITROBLUE TETRAZOLIUM (NBT) TEST . **Clin Exp Immunol.**, v. 19, p. 309-318, 1975.

SEIPEL, K. et al. Trio amino-terminal guanine nucleotide exchange factor domain expression promotes actin cytoskeleton reorganization, cell migration and anchorage- independent cell growth. **Journal of Cell Science**, v. 112, p. 1825-1834 1999.

SENDA, N. et al. The mechanism of the movement of leukocytes. **Expl Cell Res**, v. 91, p. 393-407, 1975.

SENGUPTA, K. et al. Spreading of neutrophils: from activation to migration. **Biophys J. Dec** v. 91, n. 12, p. 4638-48, 2006.

SEO, Y.; JHE, W. Atomic force microscopy and spectroscopy. **Rep. Prog. Phys**, v. 71, n. 1, p. 016101 2008.

SEVEAU, S. et al. Neutrophil polarity and locomotion are associated with surface redistribution of leukosialin (CD43), an anti adhesive membrane molecule **Blood**, v. 95, n. 8, p. 2462-70, 2000.

SHAO, J.; TING-BEALL, H.; HOCHMUTH, R. Static and dynamic lengths of neutrophil microvilli. . **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 95, p. 6797–6802, 1988.

SHAPIRO, H.; PERLMUTTER, N.; STEIN, P. A Flow Cytometer Designed for Fluorescence Calibration. **Cytometry** v. 33, p. 280–287, 1998.

SHEVCHENKO, A., WILM M, VORM O, MANN, M. Mass spectrometric sequencing of protein silver-stained polyacrylamide gels. **Anal Chem**, v. 68, p. 850–858, 1996.

SILVA, V.C. **Caracterização morfológica e funcional da adesão de neutrófilos em diferentes superfícies de titânio**. 2011. 106 p. (Doutorado). Departamento de Biologia celular UNB, Brasília.

SILVA, A.; CORREA, G. Proteômica –Uma abordagem funcional do estudo do Genoma. **SAÚDE E AMBIENTE EM REVISTA**, v. 2, n. 2, p. 1-10, 2007.

SIMON; SCHMID-SCHÖNBEIN, G. Biophysical aspects of microsphere engulfment by human neutrophils. **Biophys J**, v. 53, p. 163-173, 1988.

SIMON, H. Neutrophil apoptosis pathways and their modifications in inflammation. **Immunol Rev.** , v. 193, p. 101-10, 2003.

SIMON, S.; GREEN, C. Molecular mechanics and dynamics of leukocyte recruitment during inflammation. **Annual Review of Biomedical Engineering. United States**, v. 7, n. 8, p. 151-185, 2005.

SINGH, S. **Toxicological effects of Nanoparticles: In vitro studies with Titanium Dioxide**. 2005. 118 (PhD). Institut für Umweltmedizinische Forschung (IUF) an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, -Universität Düsseldorf, Düsseldorf.

SINGH, S. et al. Endocytosis, oxidative stress and IL-8 expression in human lung epithelial cells upon treatment with fine and ultrafine TiO₂: role of the specific surface area and of surface methylation of the particles **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 222, n. (2), p. 141–5, 2007

SMITH et al. Neutrophil traction stresses are concentrated in the uropod during migration. **Biophys. J**, v. 92, n. 7, p. L58-60, 2007.

SMITH, B. **Cellular Biomechanics Investigated by Atomic Force Microscopy**. 2004. (PhD). Centre for the Physics of Materials, Department of Physics, McGill University, Montréal.

SMITH, D. et al. Systemic metal ion levels in dental implant patients. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 12, p. 828-834, 1997.

SMOLEN, J. et al. L-Selectin Signaling of Neutrophil Adhesion and Degranulation Involves p38 Mitogen-activated Protein Kinase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 15876-15884, 2000.

SÖHNLEIN, O. **NEUTROPHIL GRANULE PROTEINS: MODULATORS OF THE IMMUNE RESPONSE**. 2008. 74p (PhD). Department of Physiology and Pharmacology Karolinska Institutet, , Karolinska Institutet,, Stockholm, Sweden.

SOLAR, R.; POLLACK, S.; KOROSTO, E. In vitro corrosion testing of titanium surgical implant alloys: an approach to understanding titanium release from implants. **J. Biomed. Mater. Res**, v. 13, p. 217-50, 1979.

SOUSA, M. et al. **Gestão da Vida. Genoma e Pós-Genoma** Brasília: Editora UNB, 2001. 144p

STARK, M. et al. Marking the Difference: Interferometric Detection vs Optical Beam Deflection in AFM. In: STM'03, Scanning tunneling microscopy/spectroscopy and related techniques:, 2003. USA. 12th: AIP Conference Proceedings. p.385-391.

STARODUBTSEVA, M. N. et al. Atomic force microscopy observation of peroxy-nitrite-induced erythrocyte cytoskeleton reorganization. **Micron**, v. 38, n. 8, p. 782-6, 2007. ISSN 0968-4328 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17693091> >.

STITES, D., TERR AI, PARSLOW TG **Imunologia Médica**. 9a. Rio de Janeiro: Guanabara, 2000.

STOMP, R. **Dissipative and Electrostatic Force Spectroscopy of InAs Quantum Dots by Non-contact Atomic Force Microscopy**. 2005. 131p. (Doctor of

Philosophy). Centre for the Physics of Materials Department of Physics McGill University Montréal, McGill University, Quebec- Canada.

STONE, V. et al. Increased calcium influx in a monocytic cell line on exposure to ultrafine carbon black. **Eur Respir J**, v. 15, p. 297-303, 2000.

SUZUKI, K. et al. Cleavage of Mitogen-Activated Protein Kinases in Human Neutrophils Undergoing Apoptosis: Role in Decreased Responsiveness to Inflammatory Cytokines. **The Journal of Immunology**, v. 166, p. 1185-1192, 2001.

SWARTZENDRUBER, D. et al. Osmium Tetroxide and Ruthenium Tetroxide Are Complementary Reagents for the Preparation of Epidermal Samples for Transmission Electron Microscopy. **Journal of Investigative Dermatology** v. 104, p. 417–420, 1995.

TAKAYAMA, S. et al. BAG-1 modulates the chaperone activity of Hsp70/Hsc70. **EMBO J (ENGLAND)** v. 16 n. 16, p. 4887–4896, 1997.

TAMURA, K. et al. Effects of particle size on cell function and morphology in titanium and nickel. **Material Transactions** v. 43, n. 12, p. 3052-57, 2002.

TAMURA, K. et al. Effects of micro/nano particle size on cell function and morphology. **Key Engineering Materials**, v. 254-256, p. 919-922, 2004.

TANG, T. et al. A role for Mac-1(CD11b/CD18) in immune complex–stimulated neutrophil function in vivo: Mac-1 deficiency abrogates sustained Fcγ receptor-dependent neutrophil adhesion and complement dependent proteinuria in acute glomerulonephritis. **J Exp Med** v. 186, p. 1853-63, 1997.

TELES, L. **Análise Proteômica Comparativa entre Neutrófilos de Indivíduos Hígidos e Neutrófilos de Indivíduos Politraumatizados**. 2005. 112p. Dissertação de Mestrado, UNB, Brasília.

TELES, L. et al. Comparison of the neutrophil proteome in trauma patients and normal controls. **Protein Pept Lett.** , v. 19, n. 6, p. 663-72, 2012

THINGHOLM, T., T.J, et al. Highly selective enrichment of phosphosrylated peptides using titanium dioxide. *Nat Protoc*, v.1, p. 1929-1935. 2006.

TINEVEZ et al. Role of cortical tension in bleb growth. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 106, p. 18581–18586, 2009.

TINOCO, A.; VALENTINE, A. Ti(IV) Binds to human Serum Transferrin more Tightly than does Fe(III). **J. Am.Chem.Soc.**, v. 127, p. 11218-11219, 2005.

TOMCZOK, J. et al. Biomaterial-induced alterations of human neutrophils under fluid shear stress: scanning electron microscopical study in vitro. **Biomaterials**, v. 17, n. 14, p. 1359-67, 1996

TORTONESE, M. Cantilevers and tips for atomic force microscopy. **IEEE Engl. Med. Biol. Mag.** v. 16 p. 28–33, 1997.

TRACHOOTHAM, D. et al. Redox Regulation of Cell Survival. **Antioxid Redox Signal**, v. 10, n. 8, p. 1343–1374, 2008.

UNFRIED, K. et al. Cellular responses to nanoparticles: Target structures and mechanisms. **Nanotoxicology** v. 1, n. 1, p. 52-71, 2007.

URBAN et al. Dissemination of wear particles to the liver, spleen and abdominal lymphnodes of patients with hip or knee replacement. **J. Bone Joint Surg. Br**, v. 82, p. 457-47, 2000.

URBAN, C., REICHARD U, BRINKMANN V, ZYCHLINSKY A. Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms **Microbiol**, v. 8, n. 4, p. 668-76, 2006.

VALADARES, M.; KLEIN, S.; QUEIROZ, M. **Avaliação dos precursores hematopoéticos em animais portadores do Tumor ascítico de Ehrlich e tratados com Dicclopentadienildiclorotitânio IV**. XXII Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia. HEMOTERAPIA, C. B. D. H. E. Porto Alegre-RS: Boletim da Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. 18: 192 p. 1996.

VALANT, J.; DROBNE, D. Biological reactivity of TiO₂ nanoparticles assessed by ex vivo testing. **Protoplasma**, v. 249, n. 3, p. 835-842, 2011.

VALOIS, C. **Estudo da expressão de moléculas de adesão celular durante a migração transendotelial dos leucócitos no pulmão de camundongos tratados com nanopartículas magnéticas recobertas com DMSA**. 2006. 89 (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília.

VAMANU, C. et al. Induction of cell death by TiO₂ nanoparticles: studies on a human monoblastoid cell line. **Toxicology in Vitro** v. 22 p. 1689–1696, 2008.

VAMANU, C. et al. Formation of potential titanium antigens based on protein binding to titanium dioxide nanoparticles. **Int J Nanomedicine** v. 3, n. 1, p. 69-74, 2008.

VAN RIJSSEL, J. et al. The Rho-guanine nucleotide exchange factor Trio controls leukocyte transendothelial migration by promoting docking structure formation. **Mol Biol Cell**, v. 23, n. 15, p. 2831-2844, 2012.

VEREYCKEN, V. et al. The Linear Motor in the Human Neutrophil Migration. **L. Physics III** v. 5, p. 1469-1480, 1995.

VILLANUEVA et al. Netting Neutrophils Induce Endothelial Damage, Infiltrate Tissues, and Expose Immunostimulatory Molecules in Systemic Lupus Erythematosus. **J Immunol Methods**, v. 187, p. 538-552, 2011.

VON ARDENNE, M. Das Elektronen-Rastermikroskop. Theoretische Grundlagen. **Zeitschrift für Physik** v. 109 n. 9–10, p. 553–572, 1938.

VORDEN, D.; L., M.; MOLLER, R. Energy Dissipation in Dynamic Force Spectroscopy of PTCDA on Ag-Si(111) $\sqrt{3} \times \sqrt{3}$ e-J. **Surf. Sci. Nanotech.** , v. 9 p. 21-25, 2011.

VORM, O.; ROEPSTORFF, P.; MANN, M. Improved Resolution and Very High Sensitivity in MALDI TOF of Matrix Surfaces Made by Fast Evaporation. **Anal. Chem**, v. 66 n. 19, p. 3281–3287, 1994.

WAGNER, J.; ROTH, R. Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. **Pharmacol Rev** v. 52, n. 3, p. 349-74, 2000.

WALIWAARA, B. et al. Blood protein interactions with titanium surfaces. **J Biomater Sci Polym**, v. 8, p. 41-8, 1996.

WALKER, A. et al. Regulation of neutrophil apoptosis and removal of apoptotic cells. **Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy** v. 4, p. 447-454, 2005.

WANG et al. Potential neurological lesion after nasal Instillation of TiO₂ nanoparticles in the anatase and rutile crystal phases. **Toxicol Lett** 2008, v. 183, p. 72-80, 2008.

WANG; SANDERSON, B.; WANG, H. Cyto and genotoxicity of ultrafine TiO₂ particles in cultured human lymphoblastoid cells. **Mutat Res** v. 628, p. 99-106, 2007.

WANG, H. et al. Apoptosis of Pulmonary Neutrophils Induced by Low Dose Titanium Dioxide and Silica. **Ann. occup. Hyg**, v. 46, n. 1 p. 210–214, 2002a.

_____. Apoptosis of Pulmonary Neutrophils Induced by Low Dose Titanium Dioxide and Silica. **Ann. occup. Hyg** v. 46, n. 1, p. 210–214, 2002b.

WANG, J. et al. Acute toxicity and biodistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration. **Toxicol Lett** v. 168, p. 176-185, 2007.

WARHEIT, D. et al. Development of a base set of toxicity tests using ultrafine TiO₂ particles as a component of nanoparticle risk management. **Toxicol Lett** v. 171, p. 99-110, 2007.

WATARI, F. et al. Internal Diffusion of Micro/Nanoparticles Inside Body. **Key Engineering Materials**, v. 361-363, p. 95-98, 2007.

WATARI, F. et al. Material nanosizing effect on living organisms: non-specific, biointeractive, physical size effects. **J. R. Soc. Interface** v. 6, p. S371–S388, 2009.

WATT, I. **The Principles and Practice of Electron Microscopy**. 2nd. New York: Cambridge University Press, 1997.

WEISS, S.; LOBUGLIO, A. Phagocytic generated oxygen metabolites and cellular injury. **Lab Invest**, v. 47, n. 1, p. 5-18, , 1982.

WELLS, C., FAWCETT JP, TRAWEGER A. et al. A Rich1/Amot complex regulates the Cdc42 GTPase and apical-polarity proteins in epithelial cells. **Cell** v. 125 p. 535-48, 2006.

WESTERMEIER, R.; NAVE, T. **Proteomics in Practice: A laboratory Manual of proteome analysis**, Germany, Weinheim: Wiley-VCH Verlag-GmbH., 2002.

WHYTE, M et al. Impairment of function in aging neutrophils is associated with apoptosis. **J Immunol Methods**, v. 150, p. 124-34, 1993.

WIDMANN, C. et al. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. **Physiol. Rev**, v. 79, (1): 143-80, 1999.

WILKIN, M.; PASQUALI, C.; APPEL, R. From Proteins to Proteomes: Large Scale Protein Identification by Two-Dimensional Electrophoresis and Amino Acid Analysis. **Bio/Technology**, v. 14, p. 61 - 65, 1996.

WILKINS, M. et al. **Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics** Berlin: Springer: 1997. 243p.

WITT, J.; SWANN, W. Metal wear and tissue response in failed titanium alloy total hip replacements. **J. Bone Joint Surg. Br.**, v. 73, p. 559-563, 1991

XIAO, J. et al. Molecular cloning, identification and characteristics of NYD-SP9: Gene coding protein kinase presumably involved in spermatogenesis. **Chinese Science Bulletin**, v. 47, n. 11, p. 896-901, 2002

XU, A. et al. Genotoxic responses to titanium dioxide nanoparticles and fullerene in gpt delta transgenic MEF cells. . **Part Fibre Toxicol** v. 6, n. 3, p. 1-13, 2009.

YANG, L., ZHENG Y. . Cdc42: a signal coordinator in hematopoietic stem cell maintenance. . **Cell Cycle**, v. 6, p. 1445-50, 2007.

YAZDIA, A. et al. Nanoparticles activate the NLR pyrin domain containing 3 (Nlrp3) inflammasome and cause pulmonary inflammation through release of IL-1 α and IL-1 β . **PNAS-Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 45, p. 1-6, 2010.

YBE, J. A. et al. Clathrin self-assembly is mediated by a tandemly repeated superhelix. **Nature Medicine**, v. 399, p. 371-375, 1999.

ZAGO, M.; FALCÃO, R.; PASQUINI, R. **HEMATOLOGIA: fundamentos e prática**. . São Paulo: Atheneu, 2005. 1090 p.

ZARBOCK, A.; LEY, K. Mechanisms and Consequences of Neutrophil Interaction with the Endothelium. **The American Journal of Pathology**, v. 172 n. 1, p. 1-7, 2008.

ZEN, K.; PARKOS, A. Leukocyte-epithelial interactions. **Curr Opin Cell Biol**, v. 15, n. 5, p. 557-64, 2003.


ZHANG; WOJCIKIEWICZ, E.; MOY, V. T. Force Spectroscopy of the Leukocyte Function-Associated Antigen-1/Intercellular Adhesion Molecule-1 Interaction. **Biophysical Journal**, v. 83, p. 2270-2279, 2002.

ZHANG, A.; SUN, Y. Photocatalytic killing effect of TiO₂ nanoparticles on Ls-174-t human colon carcinoma cells **World J. Gastroenterol**, v. 10, n. 21, p. 3191-3193, 2004.

ZHANG, X.; et al. An improved method of sample preparation on AnchorChip targets for MALDI-MS and MS/MS and its application in the liver proteomic Project. **Proteomics**. v7(14): p. 2340-2349, 2007.

ZHOU, M.; BROWN, E. CR3 and FcγRIII cooperate in generation of a neutrophil respiratory burst: requirement for FcγRII and tyrosine phosphorylation. **J. Cell Biol.** v. 125, p. 1407-16, 1994.

ANEXO A- Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UNB.


UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos

ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

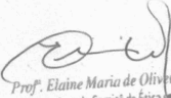
Registro de Projeto: CEP-FM 045/2010.
Título: "Análise proteômica de neutrófilos".
Pesquisador Responsável: Wagner Fontes.
Documentos analisados: Folha de rosto, carta de encaminhamento, declaração de responsabilidade, protocolo de pesquisa, termo de consentimento livre e esclarecido, cronograma, bibliografia pertinente e currículo (s) de pesquisador (es).
Data de entrega: 12/05/2010.
Parecer do (a) relator (a)
 Aprovação
 Não aprovação.
Data da primeira análise pelo CEP-FM/UNB: 26/05/2010.
Data do parecer final do projeto pelo CEP-FM/UNB: 21/07/2010.

PARECER

Com base na Resolução CNS/MS nº 196/96 e resoluções posteriores, que regulamentam a matéria, o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília decidiu **APROVAR** "ad referendum", conforme parecer do (a) relator (a), o projeto de pesquisa acima especificado quanto aos seus aspectos éticos.

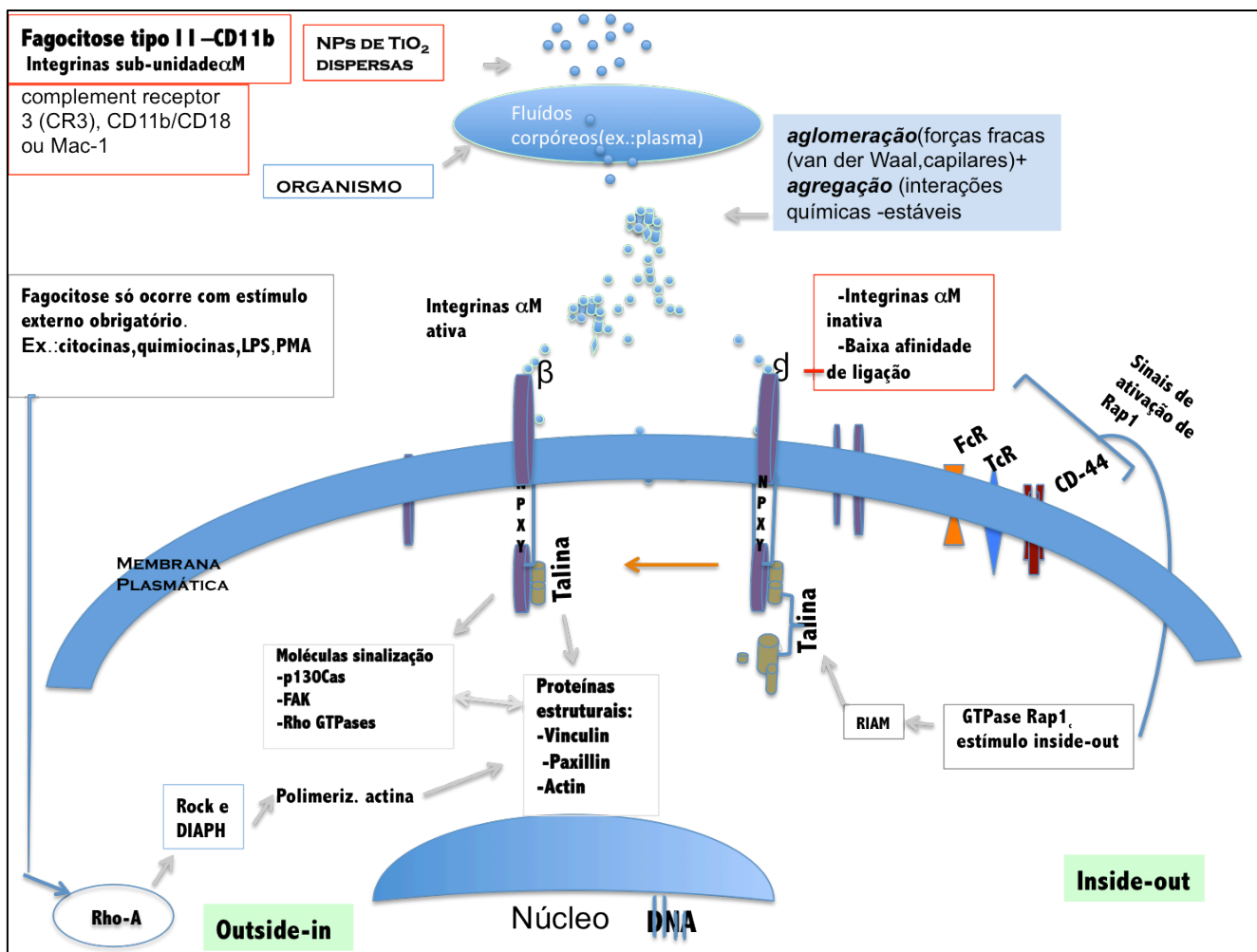
1. Modificações no protocolo devem ser submetidas ao CEP, assim como a notificação imediata de eventos adversos graves;
2. O (s) pesquisador (es) deve (m) apresentar relatórios periódicos do andamento da pesquisa ao CEP-FM, sendo o 1º previsto para até 30 de janeiro de 2010.

Brasília, 22 de Julho de 2010

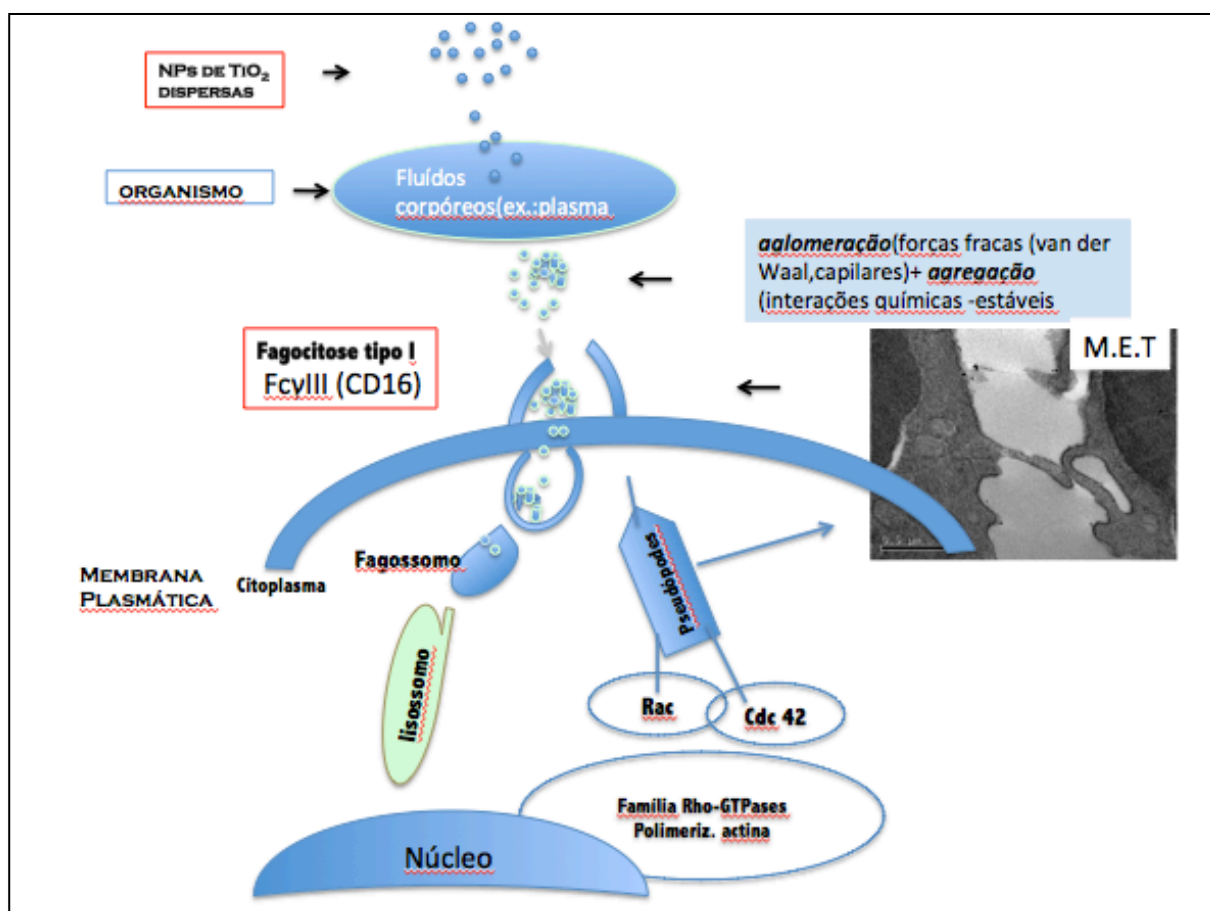

Prof. Elaine Maria de Oliveira Alves
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
Faculdade de Medicina-UNB

Campus Universitário Darcy Ribeiro, Asa Norte, Brasília, DF – CEP 70910-900
Telefone/Fax: (61) 3307 2273

ANEXO B- Demonstra a possível via metabólicas de fagocitose de NPs de TiO_2 , mediada por $\alpha M2\beta$ utilizadas pelos neutrófilos.



**ANEXO C- Demonstra a possível via metabólica de fagocitose
de agregados/aglomerados de TiO_2 por integrinas Fc γ III (CD-16)**



ANEXO D- Artigo enviado para publicação na Revista BMC Biophysics:

Kinetic effects of TiO₂ nanoparticles over nanomechanical properties of human neutrophils assessed by force spectroscopy.

MS ID : 1199179270820583

Author : Everton S Rosa

Journal : BMC Biophysics

ANEXO E- Artigo a ser publicado após conclusão do doutorado:

Morphological and Proteomic Analysis of Neutrophil Interaction with TiO₂ particles *in vitro*.

Rosa ELS^a, Aquino EN^a, Neves AC^a, Fonseca MP^a, Castro MS^a, Fontes W^a.

^a Protein Biochemical and Chemical Laboratory, University of Brasília, Darcy Ribeiro Campus, Brasília, Brazil.

ANEXO F- Identificação protéica no *Spot* 724

Proteína 3-like (isoforma 2) relacionada a microfibrilas- MFA3L

MASCOT Search Results

Protein View: [gi|57222338](#)

microfibrillar-associated protein 3-like isoform 2 [Homo sapiens]

| | | | | | |
|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| <i>(hidden)</i> | <i>(hidden)</i> | <i>(hidden)</i> | <i>(hidden)</i> | <i>(hidden)</i> | <i>(hidden)</i> |
| <i>(hidden)</i> | <i>(hidden)</i> | <i>(hidden)</i> | <i>(hidden)</i> | <i>(hidden)</i> | <i>(hidden)</i> |

Database: NCBI nr

Score: 83

Expect: 0.0013

Nominal mass (M_r): 34362

Calculated pI: 4.90

Taxonomy: [Homo sapiens](#)

This protein sequence matches the following other entries:

- [gi|13195445](#) from [Homo sapiens](#)
- [gi|44890422](#) from [Homo sapiens](#)
- [gi|63995204](#) from [Homo sapiens](#)
- [gi|119625178](#) from [Homo sapiens](#)

Sequence similarity is available as [an NCBI BLAST search of gi|57222338 against nr](#).

Search parameters

Enzyme: Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P.

Fixed modifications: [Carbamidomethyl \(C\)](#)

Variable modifications: [Acetyl \(Protein N-term\)](#), [Oxidation \(M\)](#)

Mass values searched: 23
Mass values matched: 9

Protein sequence coverage: 21%

Matched peptides shown in **bold red**.

1 **MHDSGLLNITK** VSFSDRGKY TCVASNIYGT VNNTVTLRVI FTSGDMGVYY
 51 MVVCLVAFTI VMLNITRLC **MMSSHLKKTEK** **KAINEFFRTE** GAEKLQKAFE
 101 IAKRIPIITS AK**TLELAKVTQ** **FKTMEFARY** IEELARSVPL PPLIMNCRTI
 151 MEEIMEVVGL EEQGQNFVRH TPEGQEAADR **DEVYTIPNSLKR**SDSPAADS
 201 DASSLHEQPQ QIAIK**VSVHPQ** **SKKEHADDQ** EGGQFEVKDV EETELSAEHS
 251 PETAEPSTDV TSTELTSEEP TPVEVPDKVL PPAYLEATEP AVTHDKNTCI
 301 IYESHV

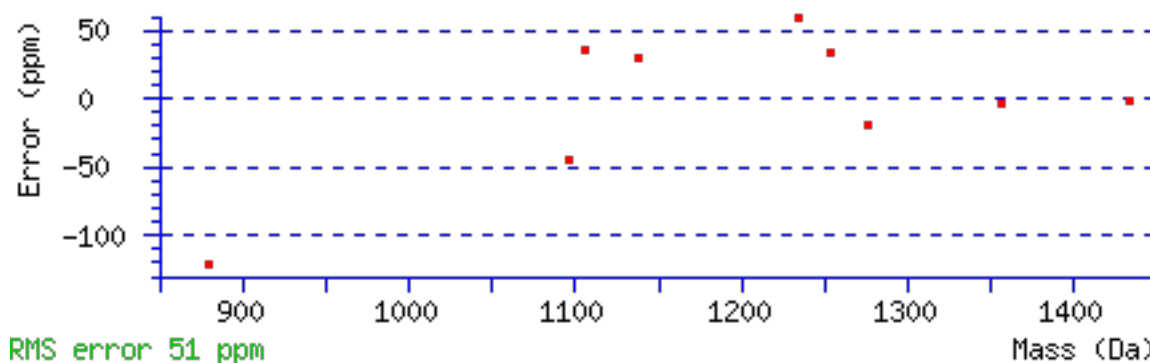
Unformatted sequence string: **306 residues** (for pasting into other applications).

Sort peptides by Residue Number Increasing Mass Decreasing Mass

Show predicted peptides also

| Start | End | Observed Mr (expt) | Mr (calc) | ppm | M | Peptide |
|-------|------|--------------------|-----------|-----------|------|---------------------------|
| 2 | -11 | 1097.5448 | 1096.5375 | 1096.5877 | 45.7 | 0 M.HDSGLLNITK.V |
| 2 | -11 | 1139.6397 | 1138.6324 | 1138.5982 | 30.0 | 0 Acetyl (Protein N-term) |
| 69 | -77 | 1106.5554 | 1105.5481 | 1105.5082 | 36.1 | 0 R.LCMMSSHLK.K |
| 69 | -78 | 1234.6829 | 1233.6756 | 1233.6032 | 58.7 | 1 R.LCMMSSHLKK.T |
| 79 | -88 | 1254.6894 | 1253.6821 | 1253.6404 | 33.3 | 1 K.TEKAINEFFR.T |
| 113 | -123 | 1277.7225 | 1276.7153 | 1276.7391 | 18.7 | 1 K.TLELAKVTQFK.T |
| 119 | -129 | 1357.6891 | 1356.6819 | 1356.6860 | 3.05 | 1 K.VTQFKTMEFAR.Y |
| 181 | -192 | 1434.7572 | 1433.7499 | 1433.7514 | 1.04 | 1 R.DEVYTIPNSLKR.S |
| 216 | -223 | 881.3771 | 880.3698 | 880.4767 | -121 | 0 K.VSVHPQSK.K |

No match to: 852.5004, 905.4410, 1130.5885, 1259.7711,
1271.5873, 1332.5531, 1407.7431, 1427.8212, 1487.7376,
1684.9657, 1699.8295, 2509.6490, 2904.0780, 3264.0635



LOCUS NP_001009554 306 aa linear
PRI 27-JUN-2012
DEFINITION microfibrillar-associated protein 3-like isoform
2 [Homo sapiens].
ACCESSION NP_001009554
VERSION NP_001009554.1 GI:57222338
DBSOURCE REFSEQ: accession NM_001009554.2
KEYWORDS .
SOURCE Homo sapiens (human)
ORGANISM Homo sapiens
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata;
Vertebrata; Euteleostomi;
Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates;
Haplorrhini;
Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE 1 (residues 1 to 306)
AUTHORS Gerhard,D.S., Wagner,L., Feingold,E.A.,
Shenmen,C.M., Grouse,L.H.,
Schuler,G., Klein,S.L., Old,S., Rasooly,R.,
Good,P., Guyer,M.,
Peck,A.M., Derge,J.G., Lipman,D., Collins,F.S.,
Jang,W., Sherry,S.,
Feolo,M., Misquitta,L., Lee,E., Rotmistrovsky,K.,
Greenhut,S.F.,
Schaefer,C.F., Buetow,K., Bonner,T.I.,
Haussler,D., Kent,J.,
Kiekhaus,M., Furey,T., Brent,M., Prange,C.,
Schreiber,K.,
Shapiro,N., Bhat,N.K., Hopkins,R.F., Hsie,F.,
Driscoll,T.,
Soares,M.B., Casavant,T.L., Scheetz,T.E., Brown-
stein,M.J.,
Usdin,T.B., Toshiyuki,S., Carninci,P., Piao,Y.,
Dudekula,D.B.,

Ko, M.S., Kawakami, K., Suzuki, Y., Sugano, S.,
 Gruber, C.E.,
 Smith, M.R., Simmons, B., Moore, T., Waterman, R.,
 Johnson, S.L.,
 Ruan, Y., Wei, C.L., Mathavan, S., Gunaratne, P.H.,
 Wu, J., Garcia, A.M.,
 Hulyk, S.W., Fuh, E., Yuan, Y., Sneed, A., Kowis, C.,
 Hodgson, A.,
 Muzny, D.M., McPherson, J., Gibbs, R.A., Fahey, J.,
 Helton, E.,
 Kettelman, M., Madan, A., Rodrigues, S., Sanchez, A.,
 Whiting, M.,
 Madari, A., Young, A.C., Wetherby, K.D.,
 Granite, S.J., Kwong, P.N.,
 Brinkley, C.P., Pearson, R.L., Bouffard, G.G.,
 Blakesly, R.W.,
 Green, E.D., Dickson, M.C., Rodriguez, A.C.,
 Grimwood, J., Schmutz, J.,
 Myers, R.M., Butterfield, Y.S., Griffith, M.,
 Griffith, O.L.,
 Krzywinski, M.I., Liao, N., Morin, R., Palmquist, D.,
 Petrescu, A.S.,
 Skalska, U., Smailus, D.E., Stott, J.M.,
 Schnerch, A., Schein, J.E.,
 Jones, S.J., Holt, R.A., Baross, A., Marra, M.A.,
 Clifton, S.,
 Makowski, K.A., Bosak, S. and Malek, J.
 CONSRTM MGC Project Team
 TITLE The status, quality, and expansion of the NIH
 full-length cDNA
 project: the Mammalian Gene Collection (MGC)
 JOURNAL Genome Res. 14 (10B), 2121-2127 (2004)
 PUBMED 15489334
 REMARK Erratum: [Genome Res. 2006 Jun;16(6):804. Morrin,
 Ryan [corrected to
 Morin, Ryan]]
 COMMENT VALIDATED REFSEQ: This record has undergone
 validation or
 preliminary review. The reference sequence was
 derived from
 BM552945.1, AF327560.1, AB014526.1 and
 AW015769.1.

 Transcript Variant: This variant (2) contains a
 distinct 5' UTR and
 lacks an in-frame portion of the 5' coding
 region, compared to
 variant 1. The resulting protein (isoform 2) has
 a shorter
 N-terminus when compared to isoform 1.

 ##RefSeq-Attributes-START##

```

Transcript_exon_combination_evidence ::
AF327560.1, BC066912.1

[ECO:0000332]
##RefSeq-Attributes-END##
FEATURES             Location/Qualifiers
    source             1..306
                       /organism="Homo sapiens"
                       /db_xref="taxon:9606"
                       /chromosome="4"
                       /map="4q32.3"
    Protein            1..306
                       /product="microfibrillar-associated
protein 3-like isoform
                       2"
                       /note="testis development protein NYD-
SP9"
                       /calculated_mol_wt=33968
    Region             <3..39
                       /region_name="Ig"
                       /note="Immunoglobulin domain; c111960"
                       /db_xref="CDD:213125"
    CDS                1..306
                       /gene="MFAP3L"
                       /gene_synonym="NYD-sp9"
                       /coded_by="NM_001009554.2:126..1046"
                       /note="isoform 2 is encoded by
transcript variant 2"
                       /db_xref="CCDS:CCDS43281.1"
                       /db_xref="GeneID:9848"
                       /db_xref="HGNC:29083"
                       /db_xref="HPRD:14391"

```

Mascot: <http://www.matrixscience.com/>

ANEXO G- Identificação protéica no Spot 815

Proteína Hsc70/Bag1 (estrutura cristalina), em complexo com ATP



MASCOT Search Results

Protein View: gi|225698069

Chain A, Crystal Structure Of Hsc70BAG1 IN COMPLEX WITH ATP

| | | | | | |
|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| (hidden) | (hidden) | (hidden) | (hidden) | (hidden) | (hidden) |
| (hidden) | (hidden) | (hidden) | (hidden) | (hidden) | (hidden) |

Database: NCBI nr

Score: 101

Expect: 2e-05

Nominal mass (M_r): 42120

Calculated pI: 6.38

Taxonomy: [Homo sapiens](#)

This protein sequence matches the following other entries:

- [gi|225698071](#) from [Homo sapiens](#)
- [gi|225698073](#) from [Homo sapiens](#)
- [gi|225698075](#) from [Homo sapiens](#)
- [gi|225698077](#) from [Homo sapiens](#)
- [gi|320089794](#) from [Homo sapiens](#)
- [gi|320089807](#) from [Homo sapiens](#)

Sequence similarity is available as an [NCBI BLAST search of gi|225698069 against nr](#).

Search parameters

Enzyme: Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P.

Fixed modifications: [Carbamidomethyl \(C\)](#)

Variable modifications: [Acetyl \(Protein N-term\)](#), [Oxidation \(M\)](#)

Mass values searched: 37

Mass values matched: 11

Protein sequence coverage: 32%Matched peptides shown in **bold red**.

1 YFQGPVAVGID LGTTYSCVGV FQHGKVEIIA NDQGNRTTPS **YVAFTDTERL**
 51 IGDAAK**NQVA MNPTNTVFDA KRL**LIGRRFDD AVVQSDMKHW PFMVVNDAGR
 101 PKVQVEYKGE TKSFPYEEVS SMVLTKM**KEI AEAYLGKTVT NAVVTVPAYF**
 151 **NDSQR**QATKD **AGTIAGLNVL R**IINEPTAAA IAYGLDKKVG AERNVLIFDL
 201 GGGTFDVSIL TIEDGIFEVK STAGDTHLGG EDFDNR**MVNH FIAEFKR**KHK
 251 KDISENKRAV **RRLRTACERA** KRTLSSSTQA SIEIDSLYEG IDFYTSITRA
 301 RFEELNADLF **RGTLDPVEKA LR**DAKLDK**SQ IH**DIVLVGG**S TRIPKIQKLL**
 351 **QDF**FNGKELN KSINPDEAVA YGAAVQAAIL S

Unformatted sequence string: **381 residues** (for pasting into other applications).

Sort peptides by



Residue Number



Increasing Mass



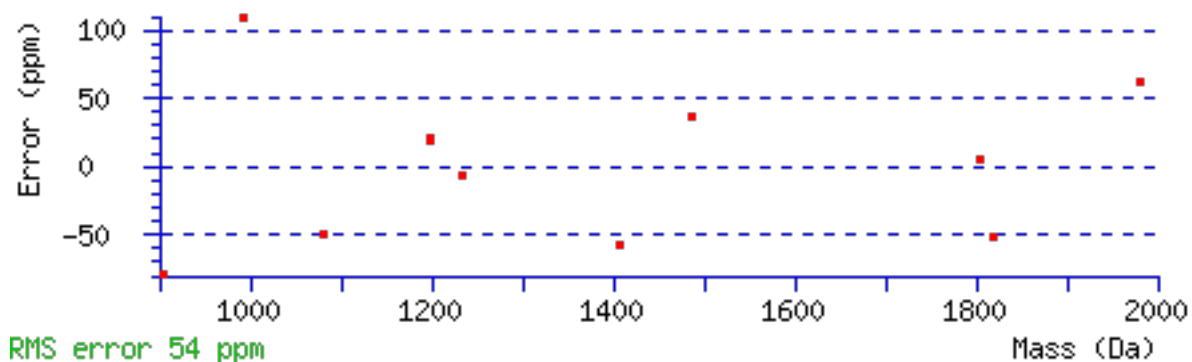
Decreasing Mass

Show predicted peptides also

| Star t | En d | Observe d | Mr(expt) | Mr(calc) | ppm M | Peptide |
|-----------|---------|---------------|---------------|---------------|-----------|--------------------------------------|
| 37 | -49 | 1487.755 7 | 1486.748 4 | 1486.694 0 | 36.6 | 0 R.TTPSYVAFTDTER.L |
| 57 | -72 | 1805.906 3 | 1804.899 0 | 1804.889 0 | 5.53 | 1 K.NQVAMNPTNTVFDAKR.L |
| 129 | -137 | 993.6327 | 992.6254 | 992.5178 | 108 | 0 K.EIAEAYLGK.T |
| 138 | -155 | 1982.122 3 | 1981.115 0 | 1980.990 5 | 62.8 | 0 K.TVTNAVVTVPAYFNDSQR .Q |
| 160 | -171 | 1199.699 3 | 1198.692 0 | 1198.667 0 | 20.9 | 0 K.DAGTIAGLNVL.R.I |
| 237 | -246 | 1235.616 7 | 1234.609 4 | 1234.616 9 | - 6.03 | 0 R.MVNHFIAEFK.R |
| 237 | -247 | 1407.639 4 | 1406.632 2 | 1406.712 9 | - 57.4 | 1 R.MVNHFIAEFKR.K + Oxidation (M) |
| 263 | -269 | 905.3915 | 904.3843 | 904.4549 | - 78.1 | 1 R.LRTACER.A |
| 312 | -322 | 1198.700 7 | 1197.693 4 | 1197.671 7 | 18.1 | 1 R.GTLDPVEKALR.D |
| 329 | -345 | 1819.944 7 | 1818.937 4 | 1819.031 6 | - 51.8 | 1 K.SQIHDIVLVGGSTRIPK. I |

| Star t | En d | Observe d | Mr(expt) | Mr(calc) | ppm M | Peptide |
|-----------|---------|---------------|---------------|---------------|-----------|----------------|
| 349 | -357 | 1081.514 3 | 1080.507 0 | 1080.560 4 | - 49.4 | 0K.LLQDFENGK.E |

No match to: 812.4371, 828.4150, 832.4058, 856.4206, 857.4999, 881.4523, 890.6002, 919.4399, 945.5535, 973.6241, 976.4953, 1064.4969, 1131.5959, 1139.5461, 1146.5347, 1182.6568, 1271.7386, 1332.6456, 1420.9883, 1427.7787, 1460.6279, 1699.7435, 1790.8759, 1838.9766, 1867.9043, 1968.0351



Proteína TRIO, proteína de ligação a F-actin



MASCOT Search Results

Protein View: gi|169145172

TRIO and F-actin binding protein [Homo sapiens]

| | | | | | |
|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| (hidden) | (hidden) | (hidden) | (hidden) | (hidden) | (hidden) |
| (hidden) | (hidden) | (hidden) | (hidden) | (hidden) | (hidden) |

Database: NCBI nr
Score: 94
Expect: 9.1e-05
Nominal mass (M_r): 28997
Calculated pI: 5.67
Taxonomy: [Homo sapiens](#)

Sequence similarity is available as [an NCBI BLAST search of gi|169145172 against nr](#).

Search parameters

Enzyme: Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P.
Fixed modifications: [Carbamidomethyl \(C\)](#)
Variable modifications: [Acetyl \(Protein N-term\)](#), [Oxidation \(M\)](#)
Mass values searched: 30
Mass values matched: 9

Protein sequence coverage: 36%

Matched peptides shown in **bold red**.

1 **MSILDEPGEP PPSLTTTST SQWKKHWFVL TDSSLKYYRD** STAAEAEELD
 51 GEIDLRSCDT VTEYAVQRNY **GFQIHTKDAV** YTLSAMTSGI RRNWIEALRK
 101 **TVRPTSAPDV TKLSDSNKEN ALHSYSTQKG** PLKAGEQRAG SEVISRGGPR
 151 KADGQRQALD YVELSPLTQA SPQRARTPAR TPDRLAKQEE LERDLAQRSE
 201 **ERRKWF EATD SRTPEVPAGE GPR**RGLGAPL TEDQQNRLSE EIEKK**WQELE**

251 KLPLRE

Unformatted sequence string: 256 residues (for pasting into other applications).

Sort peptides by

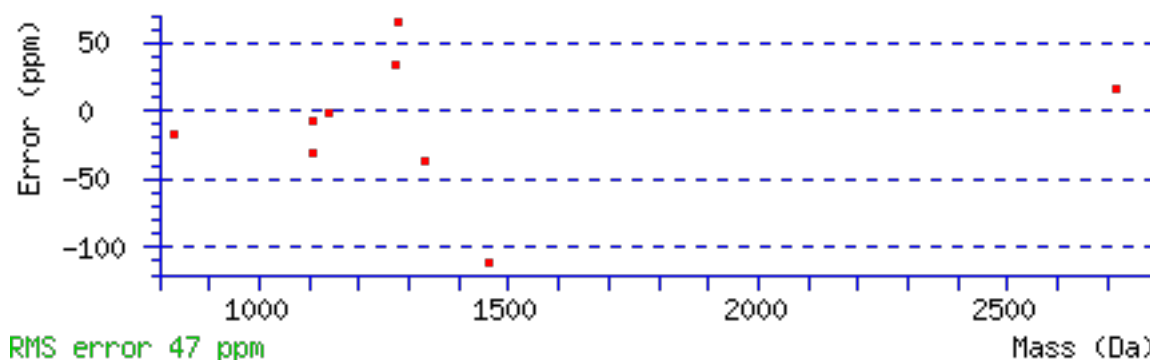
Residue Number Increasing Mass

Decreasing Mass

Show predicted peptides also

| Star t | En d | Observ ed | Mr(exp t) | Mr(cal c) | ppm M | Peptide |
|-----------|---------|--------------------|---------------|---------------|---------------|----------------------------------|
| 1 | -25 | 2717.37 50 | 2716.36 78 | 2716.32 66 | 15. 2 | 1.MSILDEPGEPSPSLTTTSTSQW KK.H |
| 25 | -36 | 1460.62 79 | 1459.62 06 | 1459.78 23 | - 111 | 1K.KHWFVLTDSLK.Y |
| 26 | -36 | 1332.64 56 | 1331.63 83 | 1331.68 74 | - 36. 9 | 0K.HWFVLTDSLK.Y |
| 69 | -77 | 1107.54 93 | 1106.54 20 | 1106.55 09 | - 8. 4 | 0R.NYGFQIHTK.D |
| 101 | -11 | 1271.73 2 86 | 1270.73 13 | 1270.68 81 | 34. 0 | 0K.TVRPTSAPDVTK.L |
| 119 | -12 | 1277.69 9 61 | 1276.68 88 | 1276.60 48 | 65. 8 | 0K.ENALHSYSTQK.G |
| 204 | -21 | 1139.54 2 61 | 1138.53 88 | 1138.54 07 | - 1.6 4 | 1R.KWFEATDSR.T |
| 213 | -22 | 1109.52 3 38 | 1108.51 65 | 1108.55 13 | - 31. 4 | 0R.TPEVPAGEGPR.R |
| 246 | -25 | 832.405 1 8 | 831.398 5 | 831.412 6 | - 17. 0 | 0K.WQELEK.L |

No match to: 812.4371, 828.4150, 856.4206, 857.4999, 881.4523, 890.6002, 919.4399, 945.5535, 973.6241, 976.4953, 1064.4969, 1131.5959, 1146.5347, 1182.6568, 1420.9883, 1427.7787, 1699.7435, 1790.8759, 1838.9766, 1867.9043, 1968.0351



LOCUS CAQ09790 256 aa linear
 PRI 13-JAN-2009
 DEFINITION TRIO and F-actin binding protein, partial [Homo sapiens].
 ACCESSION CAQ09790
 VERSION CAQ09790.1 GI:169145172
 DBSOURCE embl accession Z83844.5
 KEYWORDS .
 SOURCE Homo sapiens (human)
 ORGANISM Homo sapiens
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata;
 Vertebrata; Euteleostomi;
 Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates;
 Haplorrhini;
 Catarrhini; Hominidae; Homo.
 REFERENCE 1 (residues 1 to 256)
 AUTHORS Pearce,A.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (09-JAN-2009) Wellcome Trust Sanger
 Institute, Hinxton,
 Cambridgeshire, CB10 1SA, UK. E-mail enquiries:
 vega@sanger.ac.uk
 Clone requests: Geneservice
 (<http://www.geneservice.co.uk/>) and
 BACPAC Resources (<http://bacpac.chori.org/>)
 COMMENT ----- Genome Center
 Center: Wellcome Trust Sanger Institute
 Center code: SC
 Web site: <http://www.sanger.ac.uk>
 Contact: vega@sanger.ac.uk

This sequence was finished as follows unless
 otherwise noted: all
 regions were either double-stranded or sequenced
 with an alternate
 chemistry or covered by high quality data (i.e.,
 phred quality >=

30); an attempt was made to resolve all sequencing problems, such as compressions and repeats; all regions were covered by at least one subclone; and the assembly was confirmed by restriction digest, except on the rare occasion of the clone being a YAC.

The following abbreviations are used to associate primary accession numbers given in the feature table with their source databases:

Em:, EMBL; Sw:, SWISSPROT; Tr:, TREMBL; Wp:, WORMPEP; Information on the WORMPEP database can be found at

http://www.sanger.ac.uk/Projects/C_elegans/wormpep

This sequence was generated from part of bacterial clone contigs of human chromosome 22, constructed by the Sanger Centre Chromosome 22 Mapping Group. Further information can be found at

<http://www.sanger.ac.uk/HGP/Chr22>

RP1-37E16 is from the library RPCI-1 constructed by the group of

Pieter de Jong. For further details see

<http://bacpac.chori.org/>

VECTOR: pCYPAC2.

| FEATURES | Location/Qualifiers |
|-----------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| source | 1..256 /organism="Homo sapiens" /db_xref="taxon:9606" /chromosome="22" /clone="RP1-37E16" /clone_lib="RPCI-1" |
| Protein | 1..>256 /product="TRIO and F-actin binding |
| protein" | |
| Region | 22..101 /region_name="PH" /note="Pleckstrin homology (PH) domain; cd00821" |
| | /db_xref="CDD:176270" |
| Site | |
| order(24..30,33..39,51..55,59,60..62,71..77,80..85, 90..101) | /site_type="other" /note="core domain" /db_xref="CDD:176270" |
| Site | order(24,26..28) |

```
CDS      /site_type="other"  
         /note="putative lipid binding motif"  
         /db_xref="CDD:176270"  
         1..256  
         /gene="TRIOBP"  
         /locus_tag="Z83844.4-010"  
         /standard_name="OTTHUMP00000198156"  
         /coded_by="join(Z83844.5:125752..125778,  
Z83844.5:128827..128934,Z83844.5:129051..129140,  
Z83844.5:129500..129609,Z83844.5:131563..>131997) "  
         /db_xref="HGNC:17009"  
         /db_xref="InterPro:IPR001849"  
         /db_xref="InterPro:IPR011993"  
         /db_xref="UniProtKB/TrEMBL:B1AHE1"
```

Mascot: <http://www.matrixscience.com/>

Everton Luís Santos da Rosa

Análise morfológica e proteômica da captação de nanopartículas de dióxido de titânio por neutrófilos humanos *in vitro*.

Brasília, 2012

