



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**AUMENTO DA CONCENTRAÇÃO DE SELÊNIO NA SÍNTESE DE PONTOS  
QUÂNTICOS DE CdSe: UMA ESTRATÉGIA PARA O CONTROLE DO ESTRESSE  
OXIDATIVO NO ENCÉFALO DO EMBRIÃO DE GALINHA**

**Aluno: Danielle Diniz Vilela**

**Orientador: Foued salmen Espindola**

**Co-Orientador: Renata Roland Teixeira**

**UBERLÂNDIA - MG  
2019**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**AUMENTO DA CONCENTRAÇÃO DE SELÊNIO NA SÍNTESE DE PONTOS  
QUÂNTICOS DE CdSe: UMA ESTRATÉGIA PARA O CONTROLE DO ESTRESSE  
OXIDATIVO NO ENCÉFALO DO EMBRIÃO DE GALINHA**

**Aluno: Danielle Diniz Vilela**

**Orientador: Foued Salmen Espindola**

**Co-Orientador: Renata Roland Teixeira**

**Tese apresentada à Universidade  
Federal de Uberlândia como parte dos  
requisitos para obtenção do Título de  
Doutor em Genética e Bioquímica  
(Área Bioquímica)**

**UBERLÂNDIA - MG  
2019**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

V699a Vilela, Danielle Diniz, 1986-  
2019 Aumento da concentração de selênio na síntese de pontos quânticos de CdSe [recurso eletrônico] : estratégia para o controle do estresse oxidativo no encéfalo do embrião de galinha / Danielle Diniz Vilela. - 2019.

Orientador: Foued Salmen Espindola.  
Coorientadora: Renata Roland Teixeira.  
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.

Modo de acesso: Internet.  
Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.te.2023.8081>  
Inclui bibliografia.

1. Bioquímica. I. Espindola, Foued Salmen, 1957-, (Orient.). II. Teixeira, Renata Roland, 1983-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. IV. Título.

---

CDU: 577.1

André Carlos Francisco  
Bibliotecário - CRB-6/3408



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**AUMENTO DA CONCENTRAÇÃO DE SELÊNIO NA SÍNTESE DE PONTOS  
QUÂNTICOS DE CdSe: UMA ESTRATÉGIA PARA O CONTROLE DO ESTRESSE  
OXIDATIVO NO ENCÉFALO DO EMBRIÃO DE GALINHA**

**ALUNO: Danielle Diniz Vilela**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

**Presidente:** Foued Salmen Espindola

**Examinadores:**

**Luiz Ricardo Goulart**

**Marcelo Silva**

**José Roberto Siqueira Junior**

**Emiliana Pereira Abrão da Costa**

**Data da Defesa:** 10/07/2109

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da Dissertação/Tese foram contempladas



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

## ATA DE DEFESA

Programa de Pós-Graduação em:	Genética e Bioquímica				
Defesa de:	<a href="#">Tese de Doutorado Acadêmico - nº 09/2019 - PPGGB</a>				
Data:	10 de julho de 2019	Hora de início:	08:30h	Hora de encerramento:	<a href="#">12:15h</a>
Matrícula do Discente:	11523GBI005				
Nome do Discente:	Danielle Diniz Vilela				
Título do Trabalho:	Alteração da concentração de selênio na síntese de pontos quânticos de CdSe: Uma estratégia para o controle do estresse oxidativo no encéfalo do embrião de galinha.				
Área de concentração:	Bioquímica				
Linha de pesquisa:	Bioquímica do exercício.				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Estabelecimento de uma Rede de Nanobiotecnologia para aplicação diagnóstica e vacinal em doenças infecciosas humanas.				

Aos dez dias do mês de julho de dois mil e dezenove, às 08 horas e 30 minutos no Anfiteatro 4K, Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia, reuniu-se a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica, assim composta: Prof. Dr. José Roberto Siqueira Júnior, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Emiliana Pereira Abrão da Costa, Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho, Prof. Dr. Marcelo José Barbosa Silva e Prof. Dr. Foued Salmen Espíndola, orientador (a) do (a) candidato (a) e demais convidados presentes conforme lista de presença. Iniciando os trabalhos o (a) presidente da mesa, o Prof. Dr. Foued Salmen Espíndola, apresentou a Comissão Examinadora e o (a) candidato (a), agradeceu a presença do público, e concedeu o (à) Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do (a) Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica. A seguir o (a) senhor (a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos examinadores, que passaram a arguir o (a) candidato (a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais. Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou o (a) candidato (a):      APROVADO (A). Esta defesa de Tese de Doutorado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU. Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Marcelo José Barbosa Silva, Professor(a) do Magistério Superior**, em 10/07/2019, às 12:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Foued Salmen Espíndola, Professor(a) do Magistério Superior**, em 10/07/2019, às 12:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Luiz Ricardo Goulart Filho, Professor(a) do Magistério Superior**, em 10/07/2019, às 12:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Emiliana Pereira Abrão da Costa, Usuário Externo**, em 10/07/2019, às 12:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **José Roberto Siqueira Junior, Usuário Externo**, em 10/07/2019, às 12:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

---



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://www.sei.ufu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1367076** e o código CRC **BC72E5EA**.

---

Dedico esse trabalho a minha família que é minha base, meu porto seguro. Minhas filhas Maria Clara e Lua, que vocês possam se orgulhar do meu trabalho e que de alguma forma isso inspire vocês a buscarem seus sonhos. Meu marido Alonso que sempre me faz enxergar o melhor de mim.

## **Agradecimentos**

Ao meu orientador prof.Dr.Foued Salmen Espindola pela oportunidade de enriquecer meu conhecimento e por abrir as portas do seu laboratório. Tenho muita admiração por todo seu trabalho e preocupação em fazer da pesquisa um bem para comunidade ao seu redor.

A minha co-orientadora e amiga Renata Roland Teixeira que é um exemplo de profissional dedicada, que me ensinou além das práticas do laboratório, o verdadeiro sentido de equipe. Obrigada por dividir comigo sua vida, nosso filhos, nosso trabalho.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório, Adriele e Douglas, por toda ajuda na bancada e fora dela. Foram 6 anos juntos e passamos por muitas transformações. Sou muito grata a vocês por sempre me oferecerem sua ajuda sincera e dedicada.

Aos outros amigos de laboratório que participaram de toda trajetória ou parte dela até aqui, Allisson, Júlia, Rodrigo, Heitor, Rodrigo, André obrigada por de alguma forma contribuírem para esse trabalho em equipe.



## Sumário

1. Introdução: .....	11
1.1 Nanopartículas .....	12
1.2 Pontos quânticos (QDs).....	13
1.3 Pontos quânticos de tamanho mágico.....	15
1.4 Aplicações dos QDs .....	15
1.5 Pontos Quânticos em Biologia e Medicina .....	16
1.6 Toxicidade dos QDs .....	20
1.8 Estresse oxidativo como mecanismo para toxicidade de QDs .....	24
1.9 Estresse oxidativo e antioxidantes no sistema nervoso central.....	25
1.10 Sistema de defesa antioxidante e biomarcadores do estresse oxidativo.....	26
1.10.1 Superóxido dismutase .....	27
1.10.2 Catalase .....	27
1.10.3 Glutathione Peroxidase e Glutathione Redutase.....	28
1.10.4 Glutathione Reduzida .....	28
1.10.5 Capacidade Antioxidante Total.....	28
1.10.6 Peroxidação Lipídica .....	29
1.11 Modelo animal Embrião de galinha .....	30
2. Objetivos.....	31
2.1 Objetivo Geral.....	31
2.2 Objetivos específicos.....	31
3. Metodologia .....	32
3.1 Síntese de pontos quânticos de tamanho mágico CdSe-MSQDs .....	32
3.2 Caracterização dos CdSe-MSQDs .....	33
3.3 TBARS- <i>in vitro</i> .....	33
3.4 Grupos e procedimento experimental.....	33
3.5 Análise de marcadores de estresse oxidativo .....	34
3.5.1 Peroxidação lipídica (TBARS) .....	34
3.5.2 Capacidade Antioxidante Total (FRAP).....	34
3.5.3 Atividade de Catalase (CAT) .....	34
3.5.4 Atividade de superóxido dismutase (SOD).....	34
3.5.3 Atividade de glutathione peroxidase (GPX).....	35
3.5.4 Glutathione Reduzida (GSH).....	35
3.6 Microscopia eletrônica de fluorescência .....	35

3.7 Determinação da densidade de vasos sanguíneos em membranas corioalantóide (CAM) de embriões de galinha .....	36
3.8. Análise estatística.....	36
4. Resultados.....	36
5. Discussão .....	41
6. Conclusão.....	44
7. Referências .....	45

## Resumo

Pontos quânticos de tamanho mágico de CdSe (CdSe-MSQDs) tem sido amplamente utilizados como sondas fluorescentes em sistemas biológicos. No entanto, eles podem ser citotóxicos dependendo do seu tamanho e composição. Na tentativa de evitar danos, novas rotas sintéticas foram propostas para controlar os danos oxidativos dessas nanopartículas. O objetivo deste trabalho foi avaliar marcadores de estresse oxidativo em encéfalo de embrião de galinha exposto a CdSe-MSQDs sintetizados com diferentes concentrações de selênio. Sessenta ovos foram mantidos por dez dias em uma chocadeira com controle de temperatura e umidade. No nono, os ovos foram divididos em seis grupos e receberam uma injeção na câmara de ar. O grupo controle positivo recebeu 50 mM/ovo de 2,20-Azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH), o grupo controle negativo recebeu injeção de solução salina e os outros grupos receberam injeção contendo solução de CdSe em 4 diferentes concentrações de selênio (0,4; 0,5; 0,8; 0,9 mM). Após 24 horas, os ovos foram abertos e o encéfalo foi coletado e homogeneizado para analisar a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathionaperoxidase (GPx) e glutathionaredutase (GR), Catalase (CAT), quantidade de Glutathiona reduzida (GSH), quantificação da peroxidação lipídica (TBARS) e capacidade antioxidante total (FRAP). Além disso, foi realizada a análise da densidade vascular da membrana coriolantóide (CAM). A peroxidação lipídica, atividade das enzimas, GPx, GR, Catalase e SOD aumentou no encéfalo dos embriões expostos a CdSe-MSQDs com 0,4 mM de selênio em relação ao controle. Também houve uma diminuição na capacidade antioxidante total nesse grupo. A quantidade de GSH diminuiu nos grupos expostos a CdSe-MSQDs com 0,4; 0,5 mM de selênio. As concentrações de 0,4 e 0,5 mm de selênio causaram uma redução expressiva na densidade vascular da CAM de embriões de galinha. Nossos resultados mostraram que CdSe-MSQDs sintetizados com baixa concentração (0,4 mmol) de selênio afetaram o sistema de defesa antioxidante no encéfalo e a vascularização da CAM, enquanto que em concentrações mais elevadas de selênio, não houve dano. As maiores concentrações de selênio diminuíram a quantidade de íons cádmio adsorvidos na superfície dos CdSe-MSQDs reduzindo seu efeito citotóxico. Esses achados reforçam a importância de novas rotas sintéticas para a produção de nanomateriais com menor toxicidade, visando a sua utilização segura em sistemas biológicos.

**Palavras chave:** neurotoxicidade, pontos quânticos CdSe, estresse oxidativo.

## **Abstract**

Magic-sized quantum dots of CdSe (CdSe-MSQDs) have been widely used as fluorescent probes in biological systems. However, they may be cytotoxic depending on their size and composition. In order to avoid damage, new synthetic routes were proposed to control the oxidative damages caused by these nanoparticles. The aim of this work was to evaluate oxidative stress markers in chicken embryo encephalon exposed to CdSe-MSQDs synthesized with different concentrations of selenium. Sixty eggs were kept for ten days in a brooder with temperature and humidity control. At the ninth day, the eggs were divided into six groups and received an injection into the air chamber. The positive control group received 50 mM/egg of 2,2'-Azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH), the negative control group received saline injection and the other groups received an injection containing CdSe solution at 4 different concentrations of selenium (0.4, 0.5, 0.8, 0.9 mM). After 24 hours, the eggs were opened and the encephalon was collected and homogenized to analyze the activity of the enzymes superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) and glutathione reductase (GR) and catalase (CAT), reduced glutathione (GSH) quantification of lipid peroxidation (TBARS) and total antioxidant capacity (FRAP). In addition, analysis of the vascular density of the chorioallantoic membrane (CAM) was performed. Lipid peroxidation, enzyme activity of GPx, GR, CAT and SOD increased in the encephalon of the embryos exposed to CdSe-MSQDs with 0.4 mM of selenium compared to the control. There was also a decrease in total antioxidant capacity in this group. The amount of GSH decreased in the groups exposed to CdSe-MSQDs with 0.4 and 0.5 mM of selenium. The concentrations of 0.4 and 0.5 mM of selenium caused an expressive reduction in the vascular density of chicken embryos CAM. Our results showed that CdSe-MSQDs synthesized with low concentration (0.4 mM) of selenium affected the antioxidant defense system in the encephalon and the vascularization of CAM, whereas in higher concentrations of selenium, there was no damage. The higher concentrations of selenium decreased the amount of cadmium ions adsorbed on the surface of the CdSe-MSQDs, reducing their cytotoxic effect. These findings reinforce the importance of new synthetic routes for the production of nanomaterials with lower toxicity, for their safe use in biological systems.

**Keywords:** neurotoxicity, quantum dots CdSe, oxidative stress.

## 1. Introdução:

A utilização de nanomateriais funcionais na área biomédica tem sido amplamente explorada, entre eles, os pontos quânticos (PQs) apresentam muitas propriedades ópticas atraentes, como alta fotoluminescência rendimento quântico, absorção ampla acoplada com emissão estreita e fotoestabilidade forte (1-3). Conseqüentemente, vários tipos de PQs têm sido fabricados e utilizados para aplicações que incluem biossensores (4), sondas biológicas (5, 6) e entrega de drogas (7).

Uma classe de CdSe QDs denominada quantum magic-sized (MSQDs) tem sido destaque em vários experimentos científicos porque são estáveis ao longo do tempo e têm espectro de luminescência mais amplo do que os QDs tradicionais, o que permite serem observados por diferentes tipos de equipamentos (8, 9). Um estudo anterior demonstrou que CdSe-MSQDs tiveram alta estabilidade luminescente em cultura celular, mesmo após 36 horas (10). Outro ponto que diferem dos PQs tradicionais é o tamanho extremamente pequeno dos MSQDs, o que pode ser vantajoso para estudos celulares, já que atravessam facilmente a membrana celular. Entretanto, o tamanho da partícula e a área de superfície são considerados fatores importantes que contribuem direta e significativamente para a sua toxicidade, sendo as nanopartículas de tamanho menor, mais tóxicas (11).

Algumas modificações das propriedades do PQ podem os tornar menos tóxicos e nocivos. Em um estudo anterior, foi demonstrado que o aumento de Selênio na síntese de CdSe-MSQDs, diminui sua citotoxicidade em células, devido a mudanças na densidade de defeitos de superfície dessas nanopartículas. A densidade de defeitos está associada com a quantidade de íons cádmio adsorvida na superfície, o que afeta diretamente a citotoxicidade (12).

O fato dos CdSe-MSQDs terem cádmio, um metal pesado, em sua composição, pode dificultar suas aplicações práticas e uso em nanomedicina. Alguns estudos com PQs contendo cádmio têm reportado necrose e apoptose celular induzida por resposta ao estresse oxidativo (13). Os íons cádmio adsorvidos na superfície dos PQs podem ser liberados no citoplasma das células (14) e podem aumentar a formação de ROS de maneira indireta (15). Além disso, como mostra uma alta afinidade pelos tióis, os íons

cádmio induzem a uma depleção dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) levando a perturbação do balanço redox e a um ambiente oxidativo (16).

Para tentar sanar os danos causados por ROS, a célula dispõe de defesas antioxidantes enzimáticas (catalase, superóxido dismutase, Glutathionaredutase e peroxidase) e não enzimáticas (GSH, ácido ascórbico, alfa-tocoferol, entre outras), que atuam contra a ação tóxica dessas espécies e são responsáveis pelo equilíbrio entre a produção e a eliminação das mesmas (17), assim, a análise da atividade dessa enzimas em conjunto com a quantificação da peroxidação lipídica é uma boa estratégia para avaliar a toxicidade dos PQs nos tecidos. Nesse sentido, embriões de galinha têm sido um modelo sensível para investigar os potenciais efeitos tóxicos no desenvolvimento de órgãos e danos oxidativos devido ao baixo custo e simplicidade dos ensaios.

O objetivo desse estudo foi avaliar a citotoxicidade de CdSe-MSQDs, produzidos em diferentes concentrações de selênio, em marcadores do estresse oxidativo no encéfalo de embrião de galinha HH35 e seu efeito na vascularização da membrana corioalantóide (CAM).

## **1.1 Nanopartículas**

Nanopartículas (NPs) são uma ampla classe de materiais que incluem substâncias particuladas, que têm uma dimensão menor que 100 nm (18). O rápido crescimento da nanotecnologia transformou numerosos setores dos campos biomédico, industrial e biológico, com aplicações inovadoras nas áreas de biotecnologia, eletrônica, cosméticos, biossensores, ciência dos materiais, aeroespacial engenharia e entrega de medicamentos. Suas propriedades físico-químicas, elétricas e propriedades térmicas permitem seu uso em ciência médica, cosméticos e roupas, aumentando assim a probabilidade de exposição ambiental a esses NPs (19).

A expansão da nanotecnologia deu origem a questões relativas à potencial toxicidade de NPs, o aumento da exposição aos seres humanos e liberação no ambiente durante o seu fabrico e os seus métodos adequados uso e descarte (Li et al. 2008). O grande número de parâmetros físico-químicos de NPs, como forma, tamanho, estrutura e elementos essenciais, torna a investigação de seus efeitos tóxicos complexa e desafiadora (20). O pequeno tamanho dos NPs permite que eles atravessem membranas celulares (21) e prejudiquem diretamente o tecido atingido.

Muitos estudos nanotoxicológicos foram realizados para demonstrar o papel crítico de NPs e partículas ultrafinas na indução de estresse oxidativo e seus efeitos biológicos (22, 23).

Existe um vasto número de nanopartículas, com as mais diversas aplicações, em várias áreas. Entre eles, os pontos quânticos (QDs) apresentam muitas propriedades ópticas atraentes, as quais estão descritas a seguir.

## **1.2 Pontos quânticos (QDs)**

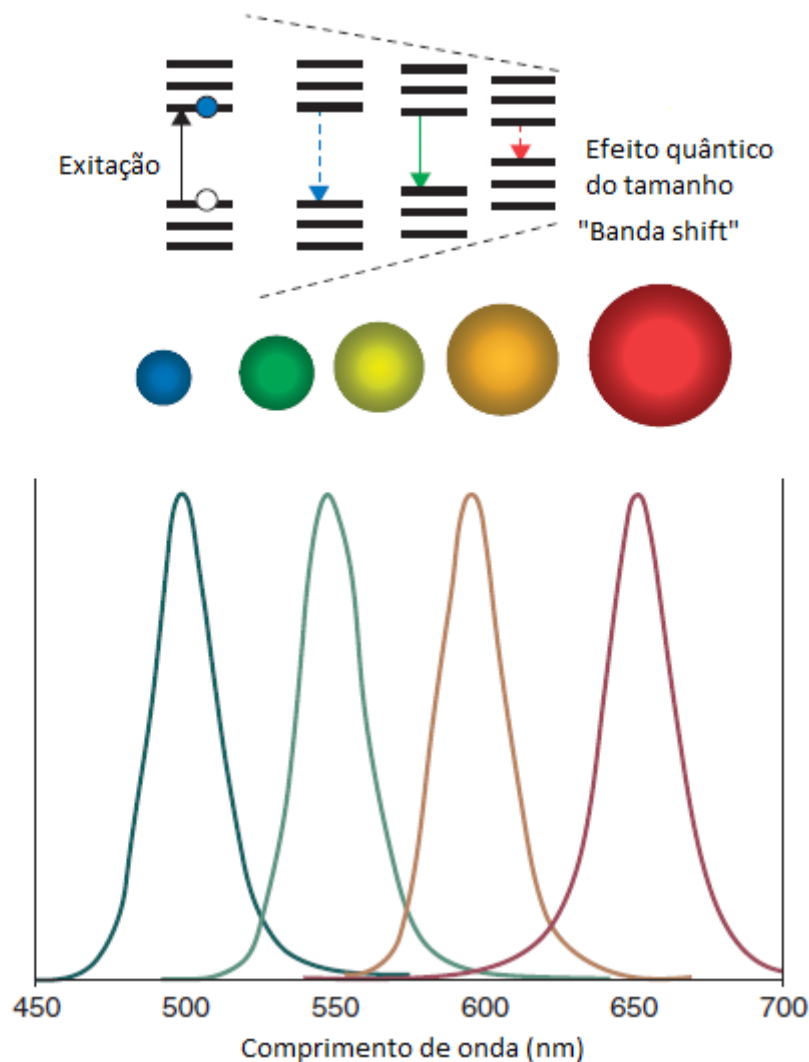
Os Quantum Dots ou QDs, são compostos por agregados de centenas a alguns milhares de átomos, com diâmetros de partícula entre os 2 e os 10 nm (24). Os seus núcleos cristalinos consistem em metais, cujos revestimentos biocompatíveis tendem a ser feitos com moléculas hidrófilas e grupos funcionais, de maneira a que apresentem a bioatividade desejada. Apresentam grande potencial para vetorização de fármacos, pois podem ser conjugados com substâncias ativas, ligandos e marcadores biológicos, e no campo da imagiologia clínica, por apresentarem espectros de fluorescência únicos (25).

Os metais semicondutores têm uma banda preenchida chamada a 'banda de valência' e uma banda vazia conhecida como a 'banda de condução'. Em dimensões nanométricas, as propriedades eletrônicas gerais do sólido tornam-se severamente distorcida e implicam no sistema de energia total e a termodinâmica (26). Nesse sentido, os pontos quânticos de CdSe são altamente adequados, pois, o comprimento de onda de absorção pode ser ajustado a todo o espectro de luz visível devido ao efeito de confinamento quântico (8). Quando um semicondutor é irradiado com luz, ou seja recebe energia, um elétron passa da banda de valência para banda de condução, deixando uma lacuna na banda de valência. O par elétron-lacuna é conhecido como éxciton. Quando o elétron retorna ao seu estado fundamental, a energia do éxciton pode ser emitida como um fóton. Este fenômeno é conhecido como fluorescência.

Baseado em modelos da teoria quântica, cientistas e engenheiros são capazes de calcular e prever algumas propriedades importantes (por exemplo, ópticas) como o tamanho de partícula semicondutor é reduzido, alcançando o valor limite onde todas essas propriedades são drasticamente alterados. Em outras palavras, para a grande maioria dos semicondutores, a redução de tamanho de partícula provoca uma divisão na distribuição de energia da banda e, portanto, maior energia bandgap ( $E_g$ ).

Isso significa que pode-se conseguir uma estrutura de banda diferente através do controle das dimensões das partículas (27, 28).

Em um modelo simplificado, a energia do fóton emitido pode ser entendida como a diferença da energia entre o nível desocupado mais baixo da banda de condução e o nível ocupado mais alto da banda de valência, ou seja, existe uma relação entre o tamanho das partículas e a energia "banda gap" de um ponto quântico semiconductor e a posição do primeiro pico de absorção e a emissão de fluorescência podem ser modulados a partir do controle do tamanho do ponto quântico durante a síntese (3). Com o aumento no tamanho do ponto quântico, ocorre um desvio para o vermelho (menor energia) tanto na emissão, como na absorção de luz. Por outro lado, pontos quânticos menores absorvem e emitem luz de cor mais azul (alta energia) (figura 1). Então, os QDs têm propriedades ópticas ajustáveis pelo tamanho que abrem possibilidades para avanços revolucionários em aplicações biológicas.





**Figura 1:** Desenho esquemático representando as mudanças no comportamento óptico das nanopartículas associadas ao seu tamanho.

### **1.3 Pontos quânticos de tamanho mágico**

Uma classe de QDs denominada pontos quânticos de tamanho mágico (MSQDs) tem sido destaque em vários experimentos científicos porque são estáveis ao longo do tempo e têm espectro de luminescência mais amplo do que os QDs tradicionais, o que permite serem observados por diferentes tipos de equipamentos (8, 9). Outro ponto que diferem dos QDs tradicionais é o tamanho extremamente pequeno dos MSQDs, o que pode ser vantajoso para estudos celulares, já que atravessam facilmente a membrana celular. Entretanto, o tamanho da partícula e a área de superfície são considerados fatores importantes que contribuem direta e significativamente para a sua toxicidade, sendo as nanopartículas de tamanho menor mais tóxicas (11).

### **1.4 Aplicações dos QDs**

Nanomedicina refere-se a medicina altamente específicas, com intervenção na escala molecular para curar doenças ou reparar tecidos danificados, restaurando sua função. Para isso, é de extrema importância a visualização de estruturas e compartimentos dentro de células e o grande número de moléculas que estão envolvidas em seu metabolismo. Assim, as estruturas e moléculas de interesse tem que marcadas a fim de serem visualmente observadas. Entre vários métodos, a técnica mais comum usada em biologia celular é a marcação por fluorescência (29). Basicamente, marcadores fluorescentes são divididos em dois grandes grupos: corantes orgânicos e nanocristais inorgânicos. Corantes orgânicos são as sondas mais comumente usadas em biologia celular e têm algumas desvantagens associadas a rápida fotodegradação, o que limita significativamente sua aplicação em imagem de longo prazo e detecção multicolorida. Por outro lado, QDs são corantes semicondutores inorgânicos que tem várias propriedades diferentes e vantagens importantes em relação aos convencionais corantes orgânicos; (1) a possibilidade opção de ajustar o comprimento de onda de emissão de QDs, alterando o tamanho do nanocristal; (2) espectros de emissão estreito e simétrico; uma única fonte de luz pode

ser usada para excitação simultânea de múltiplos semicondutores QDs com diferentes espectros de emissão de mais comprimentos de onda que a fonte; capacidade de funcionar através de ciclos repetidos de excitação/fluorescência para análise de longo prazo; (3) fotoestabilidade extrema de QDs revestidos contra fotodegradação, bem como mudanças no pH dos eletrólitos biológicos que são onipresentes em ambientes biológicos. A capacidade de tornar os QDs biocompatíveis e atóxicos estende sua aplicabilidade para imagens *in vivo*. A sua força de sinal também oferece utilidade na segmentação e aplicações de detecção. Alguns exemplos de aplicações são descritos a seguir.

### 1.5 Pontos Quânticos em Biologia e Medicina

As aplicações biológicas foram discutidas em muitos artigos e revisões. (2, 3, 30-40) (27). QDs estão sendo intensamente pesquisado como uma nova classe de nanopartículas para sondas celulares, imagens moleculares, biossensoriais e *in vivo* (41-46). O crescimento exponencial do uso desses nanocristais inorgânicos em aplicações biomédicas é devido ao fato de também poderem ser observados com alta resolução por microscopia eletrônica, entre várias vantagens já mencionadas em comparação com fluoróforos orgânicos (47). Os QDs também foram testados na maioria das aplicações biotecnológicas que usam fluorescência, incluindo tecnologia de matriz de DNA, ensaios de imunofluorescência e biologia celular e animal. Alguns dos usos bem sucedidos de QDs tem sido na marcação de célula fixas e tecidos; imunocoloração de proteínas de membrana, microtúbulos, antígenos, actina e núcleo (1, 27, 48, 49).

Apesar do progresso na síntese e conjugação de QDs, a produção de nanopartículas de tamanho extremamente pequeno ainda é uma grande preocupação tanto em aplicações biológicas *in vitro* como *in vivo*. Alguns grupos de pesquisa tentaram reduzir o diâmetro dos QDs visando melhorar aplicações de marcação de células. Por exemplo, o tamanho pode afetar a endocitose ou limitar o acesso a receptores de interesse, como aqueles na sinapse neuronal. O tamanho das partículas pode afetar drasticamente a biodistribuição e farmacocinética, sendo assim, o tamanho ótimo depende da aplicação (50-52). Em uma interpretação ampla, para tornar os QDs úteis para aplicações biomédicas, os QDs podem ser divididos em dois grandes grupos

relativos à especificidade projetada do aplicação biomédica: sondas "não direcionado e direcionadas".

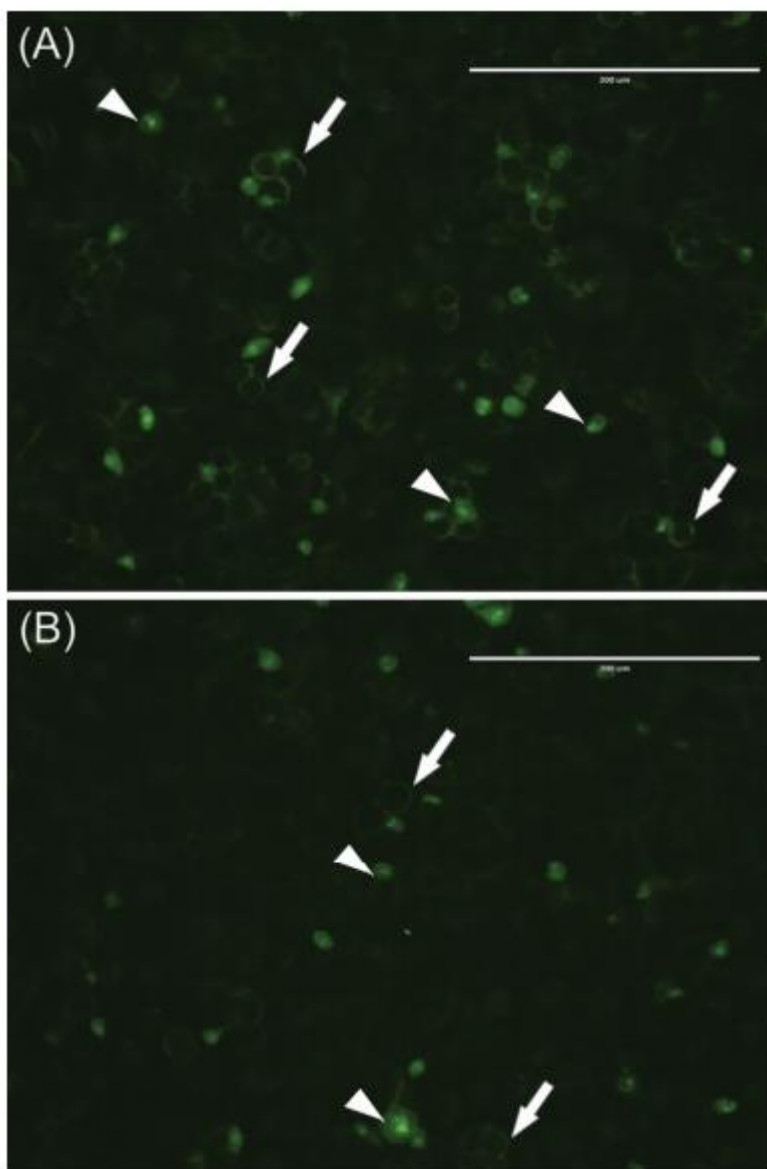
O primeiro grupo é comumente sintetizado baseado em QDs com um núcleo semicondutor passivado por uma camada protetora, seguida de revestimento com protetor orgânico, como polímeros que suprime o reconhecimento de macrófagos e pode controlar a biocompatibilidade fisiológica. O segundo grupo denominado "direcionado" é mais complexo, sua estrutura é bioconjugada a um ligante com o objetivo de alcançar o local específico de interesse. O ligante direciona os QDs para o local desejado, por exemplo um tecido doente. O acúmulo de QD no local doente aparece como uma mancha brilhante (em comparação com o tecido saudável), identificando a localização da doença (53). Algumas técnicas têm sido desenvolvidas para alcançar efetivamente estruturas celulares, como sua bioconjugação com peptídeos projetados, proteínas e seqüências de DNA (33, 35, 54). Em nosso laboratório estamos desenvolvendo a bioconjugação de MSQDs-CdSe com flavonóides antioxidantes, como quercetina e ácido gálico para diminuir sua toxicidade. (Trabalho de conclusão de curso da aluna Ana Luisa Silva Borges).

Apesar dos avanços na tecnologia de marcação, QDs ainda são um campo emergente de pesquisa onde algumas questões importantes precisam ser adequadamente abordada, tais como citotoxicidade, química de superfície para estabilizar conjugado sob condições in vivo (55). De fato, a escolha do marcador deve ser com base em várias propriedades do sistema de destino e uma única classe de fluoróforo não será a solução para todos os requisitos. Para as aplicações bem sucedidas de nanomateriais em biologia e medicina pode ser necessário que os QDs entrem nas células (52). A entrada dos nanomateriais na célula requer que eles atravessem a membrana celular que consiste em uma bicamada lipídica com proteínas em seu meio ou fixados perifericamente. Todo o processo é bastante complexo e ainda não totalmente entendido.

Uma revisão interessante aborda alguns aspectos dos mecanismos e vias da endocitose (56). Embora não seja uma questão trivial, os nanomateriais podem entrar nas células através de processos conhecidos, incluindo (1) absorção inespecífica por endocitose, onde os nanomateriais muitas vezes acabam nos compartimentos endocíticos; (2) microinjeção direta de nanomateriais, que é um procedimento tedioso e só aplicável a um número limitado de células; (3) eletroporação, que usa mecanismos

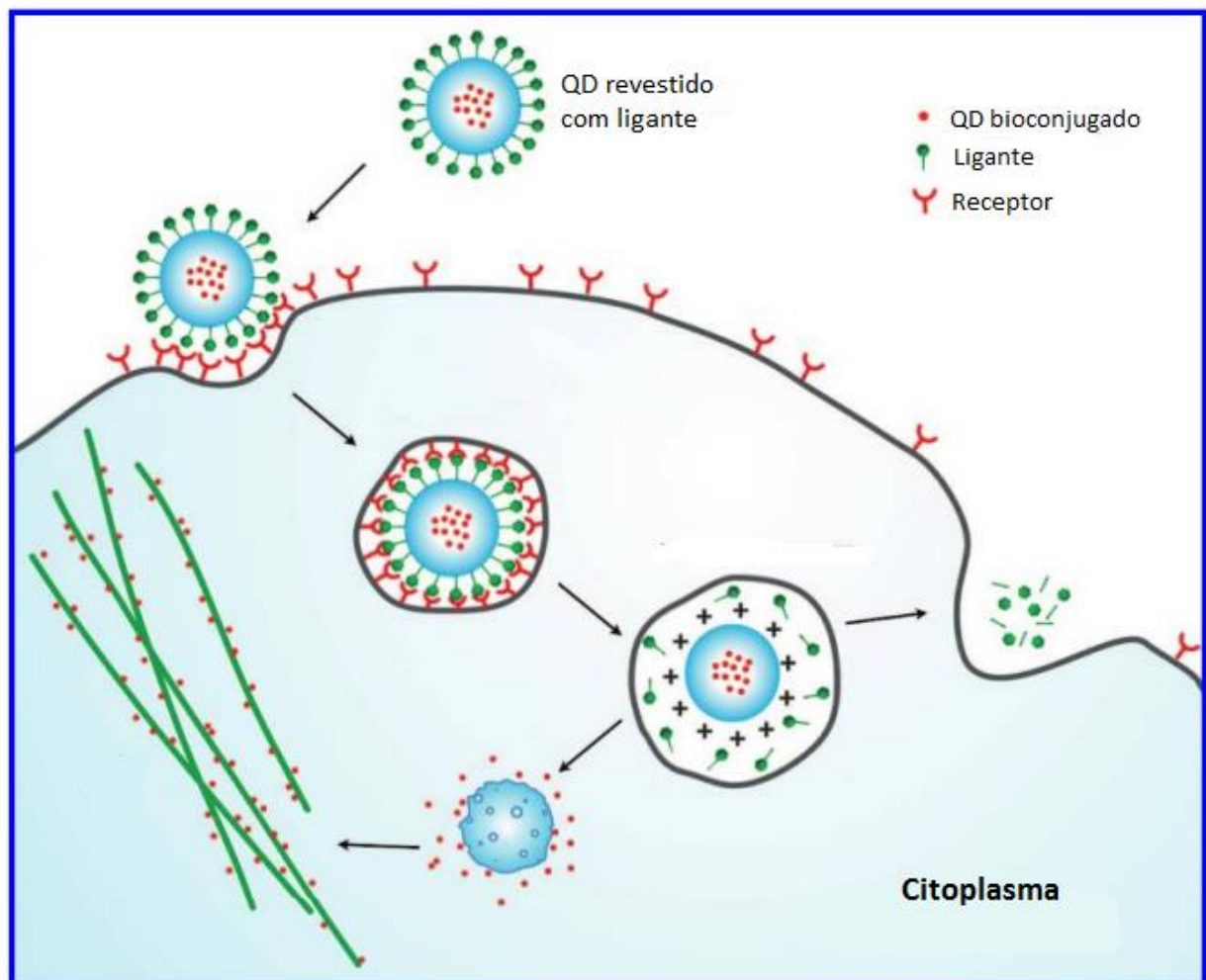
para "empurrar" fisicamente os nanomateriais pela membrana; e (4) captação mediada com base na funcionalização superficial de nanomateriais (28).

Existem algumas estratégias desenvolvidas para revestir os nanomateriais e conferir as características desejadas, um revestimento de superfície ideal deve satisfazer os seguintes requisitos básicos: (1) impedir que os nanomateriais se agreguem durante o armazenamento a longo prazo; (2) manter uma solubilidade em água; (3) manter as funcionalidades dos nanomateriais; e (4) assegurar a biocompatibilidade antes dos nanomateriais interagirem com seus alvos. Algumas pesquisas já vem trabalhando nesse sentido. Silva et. al. sintetizaram pontos quânticos de tamanho mágico CdSe (MSQDs) e observaram fluorescência em imagens de microscopia em células HeLa de mesmo após 36 horas como mostra a figura 2 (10).



**Figura 2:** Imagem fluorescente (a) após 24 h de incubação com 0,05 M de MSQDs. Após 36 h, a fluorescência é ainda visível (b). A seta branca indica que os QDs na membrana celular. Cabeça de setas indica MSQDs CdSe dentro das células. Escala barra=200  $\mu$ M. (Figura retirada de Sila, et. al. 2014 (10)).

Kim et al.106 mostraram um sistema bem projetado em QDs e nanocompósitos para marcação de células vivas (57). Ao incorporar QDs recobertos com anticorpos em polímeros biodegradáveis, eles desenvolveram um sistema de entrega endolisossômico para atarvessar a membrana, por via dependente do pH e carga de superfície do QD. Ao entrar no citosol, as nanoesferas sofrem hidrólise libertando assim os QD bioconjugados. Este abordagem facilita a marcação de células e estruturas subcelulares dentro de células vivas sem a exigência de fixação celular ou permeabilização de membrana. A figura 3 ilustra esse mecanismo.



**Figura 3:** Mecanismo de liberação citosólica e direcionamento subcelular de QD. Representação esquemática do escape de QD do compartimento endolisossômico após a internalização celular com liberação citosólica da carga encapsulada. QDs

conjugados com anticorpo podem ser entregues desta maneira para permitir a marcação de organelas subcelulares ou outros alvos moleculares. (Figura adaptada de Kim, et, al. 2006 (58))

Um artigo de revisão publicado por Nel et al. mostra as diversas interações biofísico-químicas nas interfaces entre nanomateriais e sistemas biológicos e a partir disso, é possível prever que QDs de vários tamanhos de partículas, acoplados a ligantes naturais ou sintéticos (biomoléculas e oligômeros) encapsulado em "revestimento" biocompatível será utilizado no futuro para marcação específica de células ou tecidos, e procedimentos clínicos (59). O maior desafio é entender o mecanismo de toxicidade desses materiais e promover esforços para aumentar a biocompatibilidade.

## **1.6 Toxicidade dos QDs**

Uma questão primordial que está impedindo o uso em larga escala de QDs é a sua toxicidade (60). Várias pesquisas que utilizam QDs, não mostram a toxicidade a longo prazo. Devido ao seu tamanho, extremamente pequeno e o fato de serem capazes de atravessar a membrana celular, QDs podem formar agregados, ligarem-se inespecificamente às membranas celulares e proteínas intracelulares, e induzirem a formação de espécies reativas de oxigênio. QDs maiores do que o limiar de filtração renal podem, rapidamente, acumular no sistema reticuloendotelial após administração intravenosa. Além disso, existem também preocupações sobre a toxicidade relacionada às moléculas usadas para funcionalização da superfície dos QDs (61).

O fato de os QDs possuírem componentes básicos altamente tóxicos (por exemplo, átomos de metais pesados (Cd, Hg, Pb, As, Pb) levanta sérios problemas de segurança. QDs mais comumente usados são baseados em um núcleo de CdSe (cádmio divalente), uma nefrotoxina na sua forma iônica. QDs contendo cádmio têm reportado necrose e apoptose celular induzida por resposta ao estresse oxidativo (13). Os íons cádmio adsorvidos na superfície dos QDs podem ser liberados no citoplasma das células (14) e podem aumentar a formação de ROS de maneira indireta (15). Além disso, como mostra uma alta afinidade pelos tióis, os íons cádmio induzem a uma depleção dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) levando a perturbação do balanço redox e a um ambiente oxidativo (16).

No único estudo quantitativo a longo prazo sobre QDs de biodistribuição até hoje, Yang et al. Mostrou que após a administração intravenosa de QDs contendo cádmio, a concentração de cádmio no fígado e rins aumentaram gradualmente ao longo do curso de 28 dias (62).

### **1.7 Cádmio e estresse oxidativo**

O cádmio é incapaz de catalisar reações redox em sistemas biológicos em condições fisiológicas. Entretanto, tem sido demonstrado que o Cd aumenta a concentração livre de Fe, possivelmente pela sua substituição em proteínas e, portanto, aumenta a quantidade de metais redox ativos livres (15, 63). Metais redox ativos aumentam diretamente a produção de radicais OH (hidroxila) através do Reação de Fenton.

Diferentes estudos apontam para a geração de estresse oxidativo e disfunção mitocondrial durante citotoxicidade induzida por metais (64-66). Sabe-se que a exposição ao Cd induz alterações na estrutura e função mitocondrial em animais. Já em 1971, Mustafa e Cross relataram efeitos induzidos por Cd em reações de transferência de elétrons na mitocôndria de macrófagos alveolares. Estudos confirmaram a visão geral de que as mitocôndrias são um dos principais alvos celulares de metais como Cd e discutiram potenciais mecanismos de citotoxicidade induzida por Cd (64, 67-73). Mais especificamente, Belyaeva et al. (2006) descobriram que a produção de ROS induzida por Cd provavelmente ocorre no nível de complexo III e está relacionado com a abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (MPT) (74).

Wang et al. (2004) investigou os efeitos inibitórios do Cd em relação ao complexos individuais da cadeia respiratória em mitocôndrias de fígado, cérebro e coração de camundongos. Eles mostraram que o complexo II e III são mais sensíveis para Cd do que os complexos I, IV e V. Resultados de estudos cinéticos sugerem, como possível mecanismo de geração de ROS por íons Cádmio, o acúmulo de semi ubiquinonas instáveis, propensas a transferir um elétron para o oxigênio molecular e, assim, formar o radical superóxido (75).

A lesão mitocondrial caracterizada pela perda do potencial de membranal pode levar à ativação de caspases e conseqüentemente morte celular por apoptose (76, 77). Dorta et al. (2003) definiu dois conjuntos de respostas induzidas por Cd em

mitocôndrias isoladas de fígado de rato. Em uma primeira fase, o Cd interage com tióis protéicos que levam à permeabilidade da membrana. Isto é seguido pela geração de ROS em uma segunda fase mais lenta, junto com a liberação de íons ferro, levando à peroxidação lipídica da membrana mitocondrial (15).

Superóxido dismutases (SOD) são metalo-enzimas que catalisam a dismutação de  $O_2 \cdot^-$  para  $H_2O_2$ . Atividade total de SOD durante a exposição ao Cd tem sido estudada intensivamente e ambos, aumentos e diminuições são descritos em literatura (78, 79). Essas aparentes discrepâncias podem ser atribuídas a diferentes condições de exposição, bem como ao sistema orgânico estudado. Jurczuk et al. (2004) expuseram ratos a 50 mg Cd/L (na água ingerida por eles) durante 12 semanas e notou um aumento na atividade total de SOD em rins, enquanto uma diminuição foi observada no fígado (78). A exposição aguda (24 h), no entanto, resultou em uma diminuição das atividades hepáticas e renais de SOD após administração intraperitoneal de dose única de 5 mg/kg (79).

Estudo *in vitro*, onde células neuronais corticais foram expostas por 24 horas a diferentes concentrações de Cd mostraram um aumento no total Atividade da SOD (16). Além das condições de exposição (aguda versus crônica, *in vivo* versus em *in vitro* e administração) o envolvimento de isoformas específicas localizadas em diferentes compartimentos celulares, também deve ser levado em conta (80).

A desintoxicação de peróxido de hidrogênio pode ser realizada por ambas as enzimas, catalases (CAT) e glutathione peroxidases (GPX). Catalases são enzimas contendo heme que catalisam a degradação de  $H_2O_2$  a água e oxigênio divalente sem usar quaisquer equivalentes redutores celulares (81). Um aumento na atividade da CAT no fígado de ratos foi detectada após 6 dias exposição intraperitoneal diária ao Cd (82). Estes resultados foram confirmados por experimentos em ratos que foram expostos ao Cd por 5 dias via gavagem, onde um aumento da atividade CAT foi observado no sangue (83). Por outro lado, Casalino et al. (2002) observaram redução das atividades de CAT em rins e fígados de ratos após administração intraperitoneal aguda (24 h), bem como via crônica por meio da ingestão de água potável (10 a 30 dias).

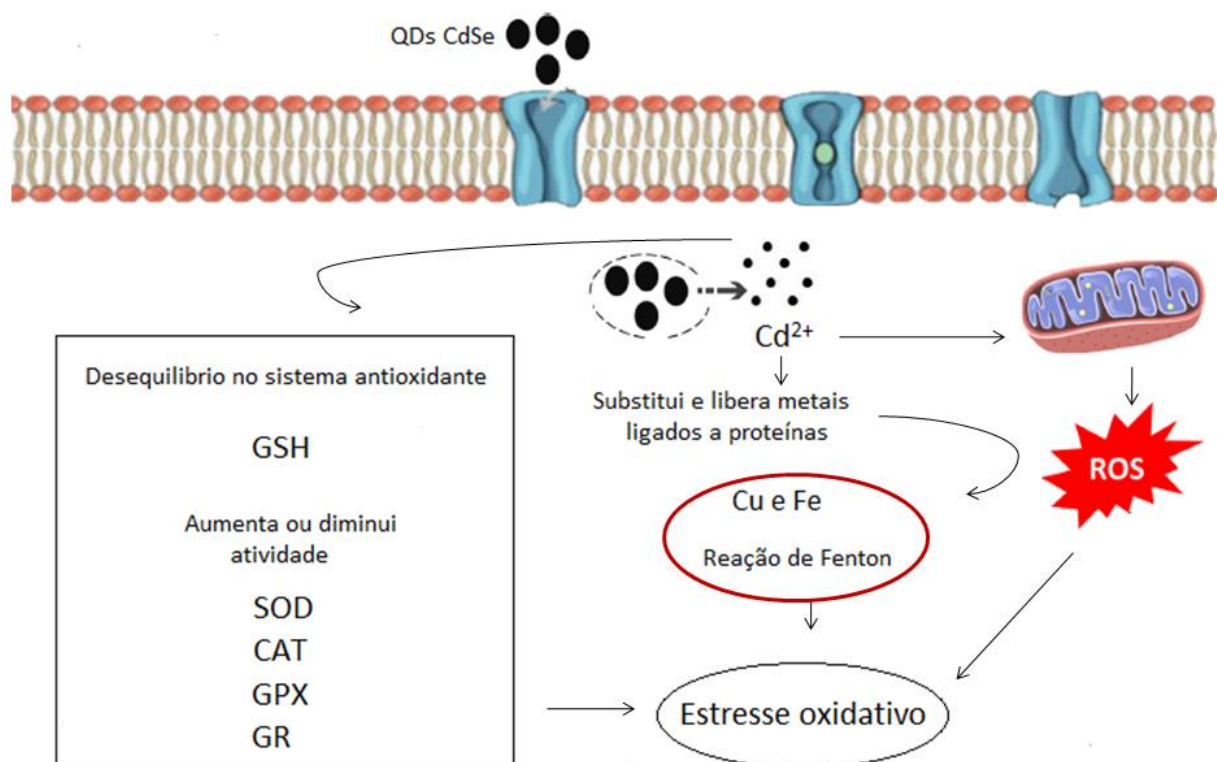
Enquanto a CAT é ativa em situações de estresse severo, é sugerido que peroxidases (Px) protegem a célula contra baixos níveis de estresse oxidativo (81), possivelmente indicando um papel no ajuste fino dos níveis de ROS importantes na transdução de sinal. Em contraste com a CAT, a desintoxicação de  $H_2O_2$  pelas peroxidases ocorre com a oxidação de outros substratos orgânicos, por exemplo a



GPX utiliza GSH como substrato. Em ratos, uma atividade aumentada de GPX foram encontradas em células sanguíneas após administração intraperitoneal ao Cd (84) (Ognjanovic et al. 2003), enquanto atividades diminuídas de GPX foram relatadas no fígado e rim de camundongos e ratos após exposição crônica ao Cd.

O tripeptídeo GSH (L-c-glutamil- L-cisteinil-glicina) é um dos mais importantes metabolitos que lidam com oxidação induzida por Cd. A glutathiona desempenha um papel predominante como substrato para GSH--transferases (GST), a fim de proteger as células contra compostos xenobióticos e oxidantes. Suas propriedades antioxidantes são atribuídas a o grupo tiol (SH-) no resíduo de cisteína (85). Nas células, GSH é mantido em sua forma reduzida pela glutathiona redutase (GR). A complexação com GSH torna o Cd livre indisponível para a célula, bloqueando assim os mecanismos que levam ao estresse oxidativo induzido por Cd, mas ao mesmo tempo, pode causar a depleção de GSH e causar um desequilíbrio no sistema redox (86).

A figura 4 mostra as possíveis vias de toxicidade de íons cádmio, sendo o estresse oxidativo, um dos mecanismos em destaque. Na sessão seguinte apresentamos como o estresse oxidativo tem um papel central na toxicidade de QDs.



**Figura 4:** Esquema que representa os possíveis mecanismos que levam ao estresse oxidativo induzido por cádmio. Íons cádmio são liberados no citossol e podem alterar o potencial de membrana da mitocôndria e aumentar a produção de ROS. Os íons cádmio substituem metais, como Fe e Cu, de proteínas como apoferritina e metalotioneína liberando-os no meio. Esses metais podem aumentar diretamente a produção de radicais OH (hidroxila) através do reação de Fenton. O cádmio pode ainda reagir com a glutathiona reduzida (GSH), causando uma depleção nos níveis desse antioxidante, e conseqüentemente, alterar todo sistema de defesa antioxidante.

### 1.8 Estresse oxidativo como mecanismo para toxicidade de QDs

As respostas biológicas das células, como o estresse oxidativo ocorre devido ao desbalanço entre a produção de ROS e a capacidade de restauração do sistema de defesa antioxidante. O excesso de ROS, como resultado da exposição de tecidos e células a QDs, leva ao aumento do estresse oxidativo e induz uma resposta das enzimas antioxidantes. No caso de oxidação moderada de estresse, ativação transcricional de enzimas antioxidantes ocorre através da indução do fator nuclear Nrf2 (87).

Em um nível intermediário, o estresse oxidativo pode ativar proteínas sensíveis a redox como proteína quinase (MAPK) e fator nuclear de cadeia leve (NF-KB) que induzem a uma cascata de sinalização produzindo uma resposta pró-inflamatória. Níveis altos de estresse oxidativo resulta em disfunção da cadeia transportadora de elétrons e dano na membrana mitocondrial, seguido de morte celular.

Os principais fatores para as influências pró-oxidantes de Qds incluem tanto o esgotamento de antioxidantes quanto o aumento da produção de ROS que tem efeitos nocivos sobre os constituintes das células incluindo lípidos, proteínas ou DNA (88). O estresse oxidativo devido à exposição a QDs pode aumentar quantidade de peroxidação lipídica, causar dano ao DNA e estimular redes de sinalização associadas à falta de crescimento celular, carcinogênese e fibrose (89).

Reações de ROS induzidas por QDs incluem ativação de citocinas inflamatórias, vias de sinalização celular, fatores de transcrição específicos e expressão de quimiocinas.

Os mecanismos celulares induzidos por QDs estão intimamente associados com transcrição de genes que contribuem para a genotoxicidade, inflamação, câncer e fibrose (90). A super expressão de enzimas antioxidantes indica o início dos efeitos de

estresse, onde a apoptose mitocondrial ocorre durante distúrbios do estresse oxidativo tóxico (87). Assim, os estudos de exposição a QDs devem incluir critérios rigorosos atribuir indicadores de estresse oxidativo in vivo e in vitro como um preditivo para avaliação de risco (91).

### **1.9 Estresse oxidativo e antioxidantes no sistema nervoso central**

Evidências patológicas de dano neuronal mediado por ROS mostra a grande vulnerabilidade a ROS na composição dos tecidos nervosos, incluindo um grupo de ácidos graxos insaturados suscetíveis à peroxidação. Os radicais livres podem atacar ácidos graxos insaturados, iniciando assim cascatas ou reações em cadeia, levando a dano de ácidos graxos insaturados vizinhos (92). Sabe-se que o cérebro é constituído de altas concentrações de ácidos graxos polinsaturados, que são mais vulneráveis a peroxidação, e apesar de seu peso relativamente baixo (2%), o o cérebro consome uma fração desordenada (20%) de oxigênio. Além disso, a quantidade de defesa enzimática no cérebro é menor em comparação com outros órgãos tecidos, e assim as células nervosas são consideradas mais suscetíveis estresse oxidativo que outros tecidos corporais (93).

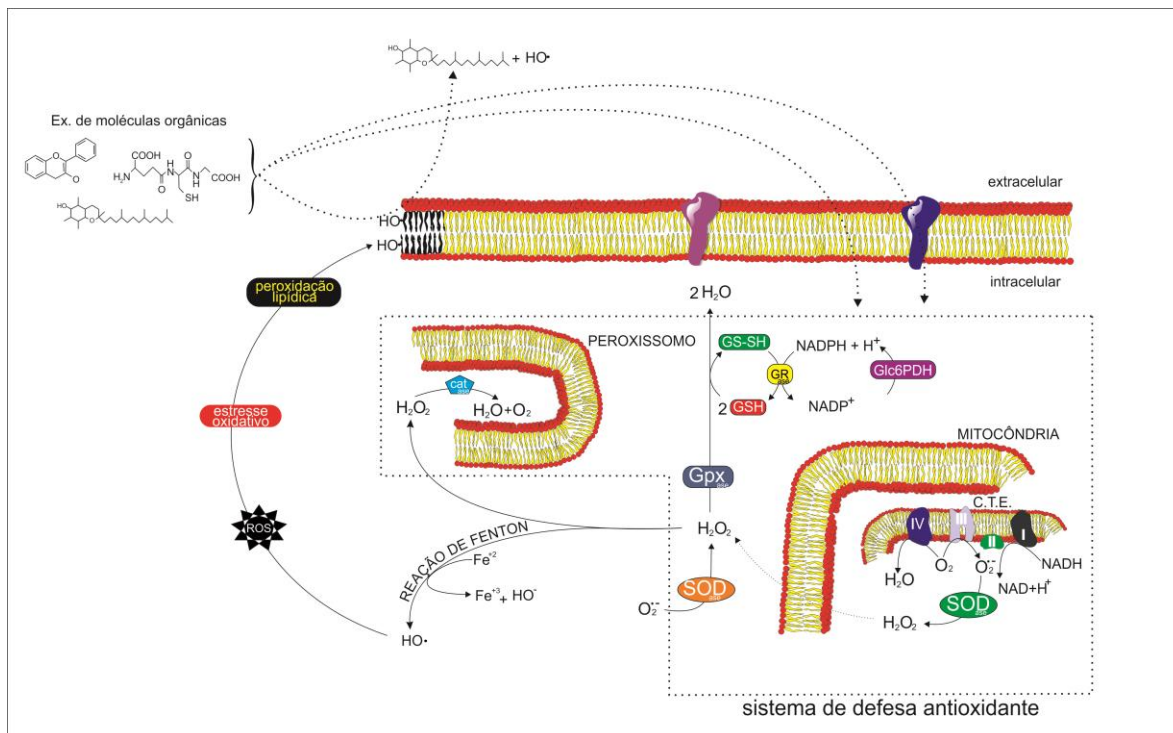
A glutatona (GSH) é um tripeptídeo contendo enxofre amino cisteína ácida que possui um grupo SH reativo com capacidade redutora. Assim, se liga aos metais dos QDs. Os íons cádmio por exemplo, induzem a uma depleção dos níveis de glutatona reduzida (GSH) levando a perturbação do balanço redox e a um ambiente oxidativo (16). Pode ser). Glutatona reduzida (GSH) é o principal antioxidante não proteico do organismo. Assim, sua depleção pode tem influência negativa sobre o equilíbrio redox no cérebro. A GSH participa na diferenciação de neurônios, modulação de neurotransmissão, regulação da apoptose e também atua como armazenamento e transportador de cisteína (94). Nesse contexto, a depleção de GSH pode ter consequências críticas no desenvolvimento de tecido cerebral.

As enzimas antioxidantes, incluindo a glutatona peroxidase (GPx), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) constituem a primeira linha de defesa contra as ROS, e a redução de sua atividade contribui aos efeitos oxidativos nocivos sobre o tecido (95). Os mecanismos de defesa por enzimas antioxidantes serão discutidos na sessão seguinte e incluem limpeza de espécies ROS, remoção de oxigênio singlete ou seus precursores, inibição da geração de ROS, ligação de íons metálicos necessários para a catálise da produção de ROS, e up-regulation de enzimas endógenas.

Foi demonstrado que QDs metálicos podem alterar drasticamente a função da barreira hematoencefálica (BHE) e sua permeabilidade em modelos animais e celulares e induzir notável edema. Além disso, nessas regiões do cérebro, ativação de células gliais, lesão de células neuronais, perda de mielinização fibras, e regulação da proteína de choque térmico são bastante freqüentes, indicando que as alterações da BHE também podem levar a alterações neurodegenerativas. e processos neuro-inflamatórios (96). Muito poucos estudos discutiram como os QDs passam pelo BBB e causam neurotoxicidade; portanto mais investigações devem ser feitas.

### **1.10 Sistema de defesa antioxidante e biomarcadores do estresse oxidativo**

Como a produção de EROs é um evento fisiológico, nosso metabolismo se dispõe de defesas antioxidantes enzimáticas (GPx, CAT, SOD, glutathionaredutase) e não enzimáticas (GSH, ácido ascórbico, alfa-tocoferol, entre outras), que atuam contra a ação tóxica dessas espécies e são responsáveis pelo equilíbrio entre a produção e a eliminação das mesmas (figura 5) (17). Quando ocorre um aumento da produção de ROS suficiente para ultrapassar a capacidade antioxidante ou agir de forma a diminuir as defesas antioxidantes do organismo; a esse fenômeno chamamos de estresse oxidativo (EO)(97, 98). Nesse sentido, as enzimas antioxidantes tem função de neutralizar as EROs. Essas enzimas podem ser utilizadas como biomarcadores uma vez que alterações na sua atividade pode ser resultado da resposta antioxidante (99).



**Figura 5:** Mecanismo de proteção do sistema de defesa antioxidante e mecanismo de peroxidação lipídica em um quadro de estresse oxidativo causada por superprodução de EROs ou diminuição da atividade de enzimas antioxidantes.

### 1.10.1 Superóxido dismutase

A SOD está na linha de frente das enzimas antioxidantes, ela catalisa a reação de conversão do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e oxigênio molecular ( $\text{O}_2$ ) na presença de  $\text{H}^+$  (100). Existem isoformas da SOD dentro da célula: CuZn-SOD é encontrada no citoplasma e no núcleo e Mn-SOD está presente na mitocôndria, mas pode ser libertada no espaço extracelular (101).

### 1.10.2 Catalase

A catalase está localizada nos peroxissomos e catalisa a redução do  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{O}_2$ . O tipo mais comum de catalase é um tetrâmero de 240 kDa, ou seja, possui quatro cadeias polipeptídicas na sua estrutura quaternária, com cerca de 60 kDa de massa. Cada cadeia polipeptídica liga um grupo hemo, semelhante ao que existe na hemoglobina, possuindo então cada hemo um íon de ferro. É este centro metálico que reage com o peróxido de hidrogênio. A atividade da enzima catalase é

consistentemente encontrada elevada no coração (102-106) e aorta (104), bem como cérebro (107) em quadros de estresse oxidativo.

### **1.10.3 Glutathione Peroxidase e Glutathione Redutase**

Tanto a glutathione peroxidase (GPx) quanto a redutase (GR) são enzimas encontradas no citoplasma, mitocôndria e núcleo. A GPx cataliza a redução do peróxido de hidrogênio em água através da GSH sendo a doadora de hidrogênio, a qual converte glutathione reduzida (GSH) em oxidada (GSSG). A reciclagem de GSH a partir de GSSG ocorre utilizando a coenzima NADPH gerado pela glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PDH) (108).

### **1.10.4 Glutathione Reduzida**

A glutathione reduzida (GSH, L-γ-glutamyl-L-cysteinyl-glycine) pode ser considerada um dos principais tampões redox intracelular. Possui capacidade redutora, devido ao seu grupamento –SH, presente em cisteína, protegendo a célula contra lesão causada pelo estresse oxidativo. (108).

Pode ser oxidada para forma GSSG, forma dimerizada da GSH. A importância deste par é tal que a razão GSH/GSSG é normalmente utilizada para estimar o estado redox dos sistemas biológicos.

### **1.10.5 Capacidade Antioxidante Total**

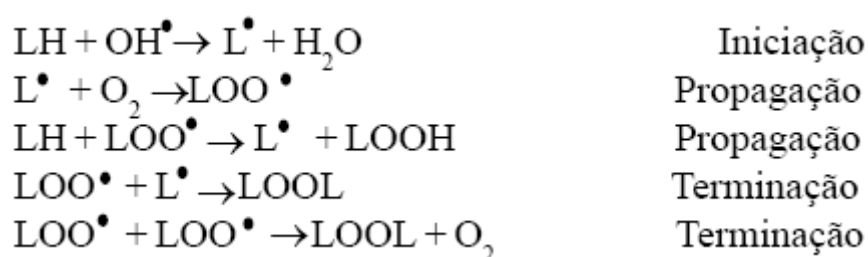
A capacidade antioxidante total, em resumo, está relacionada com a capacidade do metabolismo em proteger os sistemas biológicos dos efeitos deletérios resultantes dos processos ou reações envolvendo EROs.

O balanço redox em líquidos biológicos, organelas, células ou tecidos é determinado pela presença de pares redox responsáveis pelo fluxo de elétrons. Esses sofrem frequentes interconversões entre o estado reduzido e o oxidado. Alguns desses pares redox são interligados ("redox cycling"), outros constituem sistemas redox independentes. O balanço redox, na célula, relaciona-se à soma dos produtos do potencial de redução e da capacidade redutora de uma série de pares redox, acoplados, presentes (109).

Os diversos testes propostos na literatura variam quanto ao tipo de radicais gerados, ao indicador de oxidação escolhido e ao método usado para sua detecção e quantificação. São chamados ensaios de captação ("trapassays"). Em todos esses ensaios, um radical é gerado e reage com moléculas-alvo, para produzir cor, fluorescência, quimioluminescência, perda ou ganho de sinais de ESR ("Electron Spin Resonance" ou Ressonância do Spin Eletrônico) ou outra mudança mensurável. A presença de antioxidantes altera esses sinais, o que permite sua análise quantitativa (110).

### 1.10.6 Peroxidação Lipídica

A peroxidação lipídica é uma reação em cadeia que se inicia com o sequestro do hidrogênio do ácido graxo poliinsaturado da membrana celular pelo radical hidroxila(OH●) ou pelo radical alcóxila (LO●), resultando na formação de um radical lipídico (L●). Na primeira etapa de propagação o L● reage rapidamente com o O<sub>2</sub>, resultando na formação do radical peróxila LOO● que por sua vez sequestra outro hidrogênio do ácido graxo poliinsaturado, formando novamente o L●. A reação só termina quando os radicais L● e LOO● propagam-se até destruírem a si só (figura 5). A peroxidação lipídica pode ser catalisada por íons ferro, por conversão de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) em radicais altamente reativos (alcóxila e peróxila) que por sua vez iniciam nova cadeia de reações, denominada (111). A membrana é um dos componentes celulares mais atingidos por radicais devido a presença de ácidos graxos poliinsaturados que sofrem uma oxidação em cadeia.



**Figura 6:** Etapas da lipoperoxidação onde LH representa um ácido graxo polinsaturado, L● um radical lipídico e LOO● um radical peróxila.

As consequências da peroxidação lipídica em membranas podem ser a perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como enzimas hidrolíticas dos lisossomas e formação de produtos citotóxicos como malondialdeído

(MDA) podendo levar a morte celular. Vale lembrar que nem sempre os processos de peroxidação lipídica são prejudiciais, pois seus produtos são essenciais na formação de prostaglandinas em resposta inflamatória (112).

### **1.11 Modelo animal Embrião de galinha**

Os embriões de galinha são considerados um bom modelo para pesquisa experimental, em particular devido à falta de influências maternas na embriogênese e ao rápido desenvolvimento, permitindo uma avaliação precisa da toxicidade (Rashidi e Sottile 2009; Ribatti 2012). O crescente uso do embrião de galinha como modelo na pesquisa biológica e farmacêutica também está relacionado à sua simplicidade e baixo gasto em comparação com os modelos de mamíferos (Vargas, Zeisser- Labouebe, Lange, Gurny & Delie, 2007).

O desenvolvimento embrionário está completo no momento da eclosão aos 21 dias, como descrito nos estágios Hamburger-Hamilton (HH). Os estágios iniciais do rápido crescimento embrionário das galinhas fornecem modelo sensível para investigar os potenciais efeitos tóxicos no peso corporal, desenvolvimento de órgãos e danos oxidativos.

O cérebro do embrião começa a se desenvolver nas primeiras 24 horas de incubação, a extremidade anterior do tubo neural aumenta para formar o cérebro. No estágio 36 (10 dias) a flexão craniana quase desaparece e a flexão cervical é reduzida, ou seja, o pescoço é menos convexo e a cabeça não é mais dobrada contra o tórax. Nessa fase de desenvolvimento o embrião ainda não apresenta resposta imune, somente a partir do 14º dia de desenvolvimento embrionário que o sistema imune começa a apresentar respostas, a transferência de IgY do saco da gema para a circulação do embrião inicia-se no 7 dia de estágio embrionário e aumenta progressivamente do 14 ao 21 dia da vida intra-ovo (113), ou seja, esse período de desenvolvimento HH36 é uma boa alternativa para observar a resposta ao estresse oxidativo, sem interferência, ainda, do sistema imune.

A membrana corioalantóide (CAM) é um sistema circulatório importante no embrião de galinha. É comumente usado para estudar a angiogênese e sua inibição em resposta a agentes tóxicos in vivo. Quando o embrião cresce 34HH (8 dias embrionários), um sistema integrado de vasos sanguíneos de CAM é formado, originando assim uma rede de capilares que permitir o contato próximo com o ar vindo dos poros da membrana da casca do ovo. Funciona para transporte de cálcio, troca de



gás, equilíbrio ácido-base e reabsorção de eletólitos (Gabrielli & Accili, 2010; Gilbert, 2010). A rápida proliferação celular vai até 37HH (dia 11); a partir de então, sua velocidade diminui. (Armstrong, Voyles, Armstrong, Fuller, & Rutledge, 2011). Fortes evidências experimentais indicam que aumento do estresse oxidativo e dano oxidativo associado podem causar lesões vasculares graves. O aumento das ROS levaria à disfunção endotelial e peroxidação lipídica (Touyz, 2004).

## **2. Objetivos**

### **2.1 Objetivo Geral**

O objetivo desse estudo foi avaliar a toxicidade de CdSe-MSQDs, produzidos em diferentes concentrações de selênio, em marcadores do estresse oxidativo no encéfalo de embrião de galinha HH35 e seu efeito na vascularização da membrana corioalantóide (CAM).

### **2.2 Objetivos específicos**

Avaliar no encéfalo de embriões de galinha de HH35 expostos a CdSe-MSQDs, produzidos em diferentes concentrações de selênio, a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX), glutathione reductase (GR) e quantidade de glutathione reduzida (GSH).

Quantificar a peroxidação lipídica (TBARS) e capacidade antioxidante total (FRAP) no encéfalo de embriões de galinha de HH35 expostos a CdSe-MSQDs, produzidos em diferentes concentrações de selênio.

Qualificar e quantificar a densidade vascular da membrana corioalantóide dos embriões de galinha de HH35 expostos a CdSe-MSQDs, produzidos em diferentes concentrações de selênio

### **3. Metodologia**

#### **3.1 Síntese de pontos quânticos de tamanho mágico CdSe-MSQDs**

Os CdSe-MSQDs foram sintetizados em soluções coloidais aquosas à temperatura ambiente. Uma solução de NaHSe com  $y$  mmol de selênio e 2 mmol de NaBH<sub>4</sub> foi preparada num balão de três tubuladuras contendo 10 ml de água ultrapura e numa atmosfera inerte de argônio, com  $y = 0,4, 0,5, 0,8$  e  $0,9$  mmol. Uma segunda solução foi preparada contendo 2 mmol de Cd (ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 3 mmol de 1-tioglicerol e 40 ml de água ultrapura. As soluções foram misturadas e refluxadas durante 30 minutos. Em seguida, os nanopós foram produzidos por centrifugação da solução aquosa coloidal e depois secagem do precipitado resultante em vácuo. Finalmente, os nanopós foram monodispersos em água ultra pura.

### **3.2 Caracterização dos CdSe-MSQDs**

O espectro de absorção foi obtido em temperatura ambiente usando um espectrofotômetro UV - VIS - NIR de feixe duplo Shimadzu UV-3600 (Nishinokyo-Kuwabara-cho, Nakagyo-ku, Kyoto, Japão), operando entre 190 e 3300 nm e resolução espectral de 1 nm. Os espectros de fluorescência foram registrados com um espectrofotômetro Cary Eclipse (Varian - Palo Alto, CA, EUA), utilizando um comprimento de onda de 357 nm de uma lâmpada de xenônio como fonte de excitação.

### **3.3 TBARS- *in vitro***

A peroxidação lipídica *in vitro* foi realizada pelo método descrito por Anup et al. (2006) com modificações. O fígado de ratos saudáveis foi retirado e homogeneizado em tampão fosfato (50 mM, pH 7,4) em 10 volumes (v/p) e centrifugado a 3000 x g durante 10 minutos e o sobrenadante foi utilizado nas análises. Os QDs(0,25 mL) foram então incubados com 0,5 mL de sobrenadante dehomogeneizado, 0,9 mL de tampão fosfato (50 mM, pH 7,4) e 0,25 mL de ácido ascórbico (0,1 mM) a 37 ° C por 24 horas e a reação foi parada com adição de 1 mL de TCA 20%. Após centrifugação a 3000 x g por 15 min, o sobrenadante foi incubado com 1 mL de TBA (0,67%) a 100 ° C por 15 min. A absorbância do complexo foi medida a 532 nM.

### **3.4 Grupos e procedimento experimental**

Os ovos, linhagem Hy-line W-36, foram obtidos pelo Incubatório Novo Mundo, localizado na cidade de Uberlândia-MG. Os ovos fertilizados foram mantidos em incubadora automática, a 37°C e 70% de umidade até que os embriões atingissem o estágio de desenvolvimento de Hamburger-Hamilton (HH) desejado. No 9º dia (HH35) de incubação, os ovos foram divididos em 6 grupos (n= 10 animais/grupo) e receberam injeção de 100 uL na câmara de ar, com CdSe-MSQDs sintetizados com diferentes concentrações de selênio(0,4; 0,5; 0,8 e 0,9 mmol). No controle positivo, foi injetado cloridrato de 2,2'-azobis(2-amidinopropano)(AAPH) a 50 mmol/ovo de acordo com o método descrito anteriormente(114, 115). Para o controle negativo, os ovos foram injetados com solução salina (0,72% cloreto de sódio). Após 24 horas de incubação os ovos foram abertos, o registro fotográfico da CAM foi realizado e

osencéfalos foram homogeneizados em potter com tampão fosfato de sódio (1:10 p/v , pH 7.4) e centrifugados a 8000 xg e o sobrenadante foi utilizado nas análises. A concentração total de proteína foi medida utilizando o método de Bradford (116). O protocolo do modelo de embrião de galinha foi realizado de acordo com o método descrito anteriormente (114) e todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Uberlândia (CEUA/UFU), número do protocolo 040/17.

### **3.5 Análise de marcadores de estresse oxidativo**

#### **3.5.1 Peroxidação lipídica (TBARS)**

A peroxidação lipídica foi medida no homogeneizado do encéfalo dos embriões pela reação do malondialdeído (MDA) na amostra com o ácido tiobarbitúrico (0,67%). A fase orgânica foi avaliada em fluorímetro a 515 nm de excitação e 553 nm de emissão. A curva padrão de MDA permitiu a quantificação deste composto nas amostras, por meio de regressão linear (117).

#### **3.5.2 Capacidade Antioxidante Total (FRAP)**

Os antioxidantes presentes nas amostras reduzem o  $Fe^{+3}$  (solução de cloreto férrico 20 mM) para  $Fe^{+2}$ , que é quelado pela 2,4,6-tri (2piridil) -striaizina (TPTZ 10 mM), formando o complexo  $Fe^{+2}$ - TPTZ, que tem uma cor azul intensa. Este complexo foi avaliado no espectrofotômetro a 593 nm(118).

#### **3.5.3 Atividade de Catalase (CAT)**

A atividade da CAT foi determinada com base na redução da absorbância do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) a 240 nm, em uma solução contendo 20 mM de  $H_2O_2$ , 0,1% de Triton X-100, 10 mM de tampão fosfato de potássio (pH 7,0) e 10 µl de amostra (119). A unidade CAT é definida como 1 µ mol de  $H_2O_2$  consumida por minuto e a atividade específica foi calculada em U/mg de proteína.

#### **3.5.4 Atividade de superóxido dismutase (SOD)**

A atividade da SOD baseia-se na capacidade de auto-oxidação do pirogalol (120). Para a determinação da atividade da SOD, foram misturados 15µl de amostra, 80 U/mL de CAT, 0.38 mM de pirogalol e a solução foi analisada utilizando um espectrofotômetro a 420 nm. Uma curva de calibração foi realizada usando SOD purificada como padrão. A inibição da auto-oxidação de 50% do pirogalol é definida como uma unidade SOD. Os resultados foram calculados em U/mg de proteína.

### **3.5.3 Atividade de glutatona peroxidase (GPX)**

Para medir a atividade da GPX, o homogeneizado foi incubado com tampão Gpx (100 mM de fosfato de potássio com 1 mM de EDTA pH 7,7), 40 mM de azida sódica, GSH (diluída em 5% de ácido metafosfórico), GR (diluída em tampão Gpx), NADPH (diluído em bicarbonato de sódio 5%) e terc-butil 0,5 mM. O decaimento da concentração de NADPH foi avaliado por 10 minutos em espectrofotômetro, a 340 nm (121).

### **3.5.4 Glutathiona Reduzida (GSH)**

O teor de proteína das amostras foi inicialmente precipitado pelo ácido metafosfórico (MPA) na proporção 1: 1 (homogeneizado / MPA). As amostras foram centrifugadas a 7000 × g por 10 minutos e o sobrenadante foi utilizado para as análises. Uma curva padrão de GSH (0,001-0,1 mM) foi feita para quantificar a GSH nas amostras usando uma regressão linear. A GSH reage com orto-ftalaldeído (OPT 1 mg / mL de metanol) diluído em tampão fosfato de sódio monobásico (0,1 M) e EDTA (0,005 M). A leitura foi realizada em fluorômetro com excitação de 350 nm e emissão de 420 nm (122).

## **3.6 Microscopia eletrônica de fluorescência**

O encéfalo foi separado para exame microscópico 4 horas após a injeção. As fatias do órgão (10 µm) foram preparadas com criostato, secas ao ar por 30 minutos e fixadas com paraformaldeído a 2% por 10 minutos. Os núcleos foram corados pelo DAPI (de coloração azul), e o sinal de QDs (de coloração vermelha) foi adquirido com microscopia eletrônica de fluorescência (ampliação × 40X).

### **3.7 Determinação da densidade de vasos sanguíneos em membranas corioalantóide (CAM) de embriões de galinha**

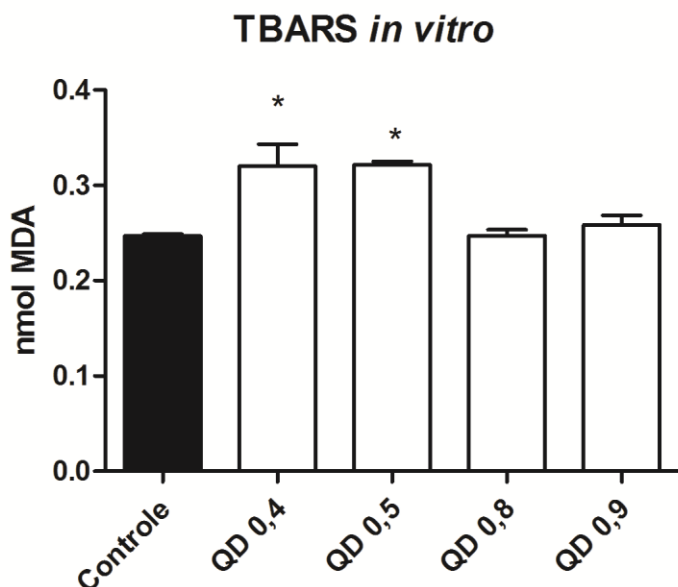
Dez CAMs de cada grupo foram examinados. A CAM foi fotografada por câmera digital (12,1 MPixels) com zoom digital de 10 X (f/2.8) e as áreas ocupadas pelos vasos sanguíneos foram quantificadas com o auxílio do programa de processamento de imagens Image J (<https://imagej.net/ImageJ>), juntamente com o plugin VesselAnalysis ([https://imagej.net/Vessel\\_Analysis](https://imagej.net/Vessel_Analysis)). Com o ImageJ, a imagem alvo é aberta e selecionada a opção Plugins>VesselAnalysis>VesselAnalysis (complete), selecionando a área desejada da imagem em seguida. O plugin automaticamente converte a imagem para o formato ideal (.Tif) e gera uma versão binária, em preto e branco. A versão binária é então selecionada, e através da opção Plugins>VesselAnalysis, é selecionada a região de interesse, no caso a membrana do ovo. O valor da densidade vascular foi obtido pelo cálculo (área dos vasos/área total) x 100.

### **3.8. Análise estatística**

Todos os valores são apresentados como média  $\pm$  SEM. A análise dos biomarcadores de estresse oxidativo foi realizada por ANOVA, seguida da comparação múltipla de Dunnett como pós-teste, comparando todos os grupos com o controle (solução salina). Todas as análises foram realizadas no programa GraphPadPrism (GraphPadPrism para Windows; GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

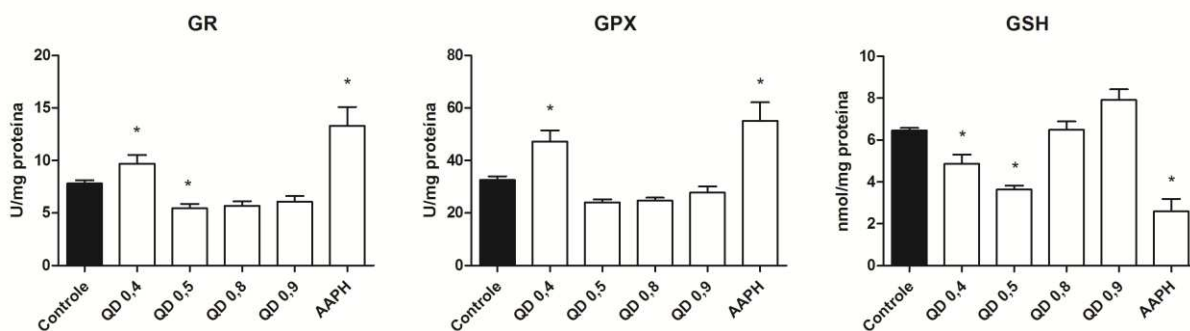
## **4. Resultados**

Nos resultados in vitro, no homogeneizado de fígado de rato exposto aos diferentes QD podemos observar que houve aumento da peroxidação lipídica no fígado de ratos saudáveis, expostos a CdSe-MSQDs com QD 0,4 e 0,5 mmol de selênio em relação ao controle. Os homogeneizados incubados com CdSe-MSQDs 0,8 e 0,9 mmol de selênio não mostraram diferença na produção de MDA em relação ao controle negativo.



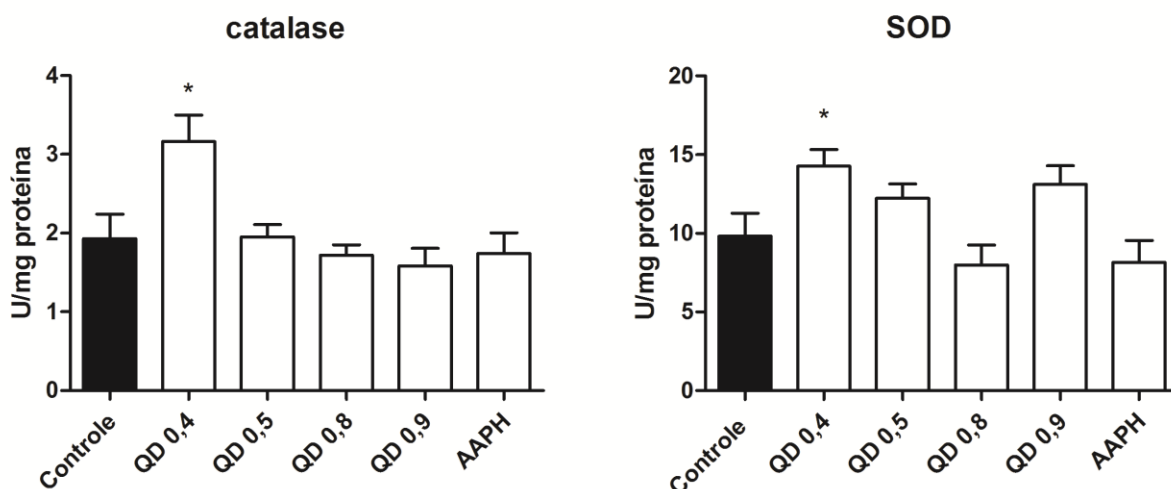
**Figura 7:** Peroxidação lipídica (TBARS) em homogeneizado de fígado de ratos saudáveis expostos a solução salina (controle negativo), CdSe-MSQDs sintetizadas em diferentes concentrações de selênio (QD 0,4–0,9 mmol) e AAPH (2,20-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride). \*  $p < 0,05$  comparado com controle.

Houve um aumento da atividade das enzimas GR e Gpx no encéfalo dos embriões expostos a CdSe-MSQDs com 0,4 mmol de selênio e no grupo AAPH. No grupo CdSe-MSQDs com 0,5 mmol de selênio houve uma diminuição da atividade da enzima GR. Além disso, foi observado uma diminuição na quantidade de GSH no encéfalo dos embriões expostos a CdSe-MSQDs com 0,4 e 0,5 mmol de selênio e no grupo AAPH (Figura 2).



**Figura 8:** Sistema de defesa antioxidante da glutatona no encéfalo de embriões de galinha (HH35) expostos a solução salina (controle), CdSe-MSQDs sintetizadas em diferentes concentrações de selênio (QD 0,4–0,9 mmol) e AAPH 2,2'-azobis (2-amidinopropano). \*  $p < 0,05$  comparado ao controle.

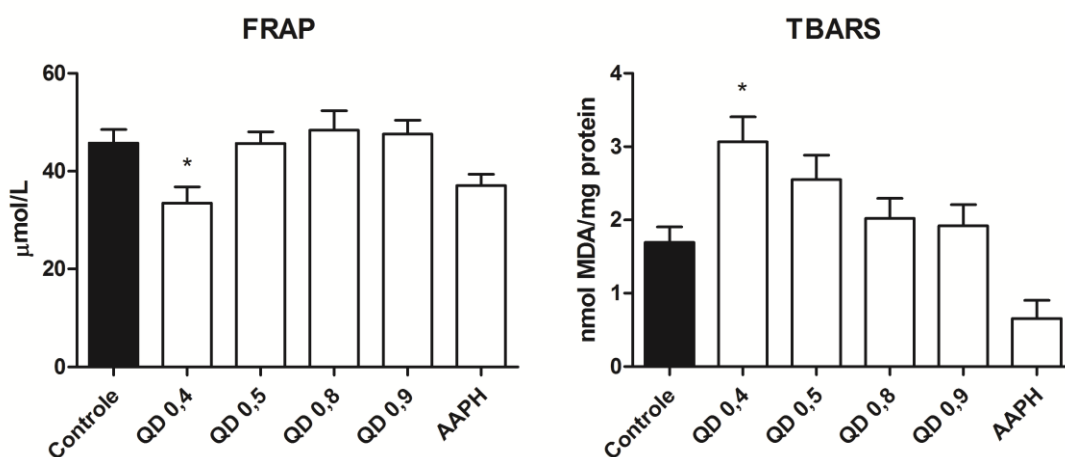
Houve um aumento da atividade da enzima SOD no encéfalo dos embriões com CdSe-MSQDs sintetizados com as menores concentrações de selênio (0,4 e 0,5 mmol) em relação ao controle. A atividade da enzima catalase aumentou somente nos encéfalos de embriões expostos a CdSe-MSQDs sintetizados com 0,4 mmol de selênio em relação ao controle negativo (Figura 3).



**Figura 9:** Atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase em encéfalo de embrião de galinha (HH35) expostos a solução salina (controle), CdSe-MSQDs sintetizadas em diferentes concentrações de selênio (QD 0,4–0,9 mmol) e AAPH 2,2'-azobis (2-amidinopropano). \*  $p < 0,05$  comparado com controle.

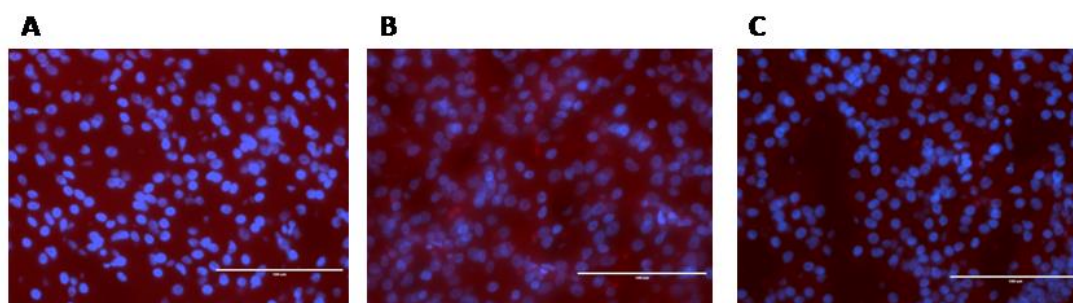


A figura 4 mostra uma diminuição na capacidade antioxidante total, e um aumento na peroxidação lipídica no encéfalo de embriões de galinha expostos a CdSe-MSQDs com 0,4 mmol de selênio em relação ao controle.



**Figura 10:** Capacidade antioxidante total (FRAP) e peroxidação lipídica (TBARS) em encéfalo de embrião de galinha (HH35) expostos a solução salina (controle negativo), CdSe-MSQDs sintetizadas em diferentes concentrações de selênio (QD 0,4–0,9 mmol) e AAPH 2,2'-azobis (2-amidinopropano). \*  $p < 0,05$  comparado com controle.

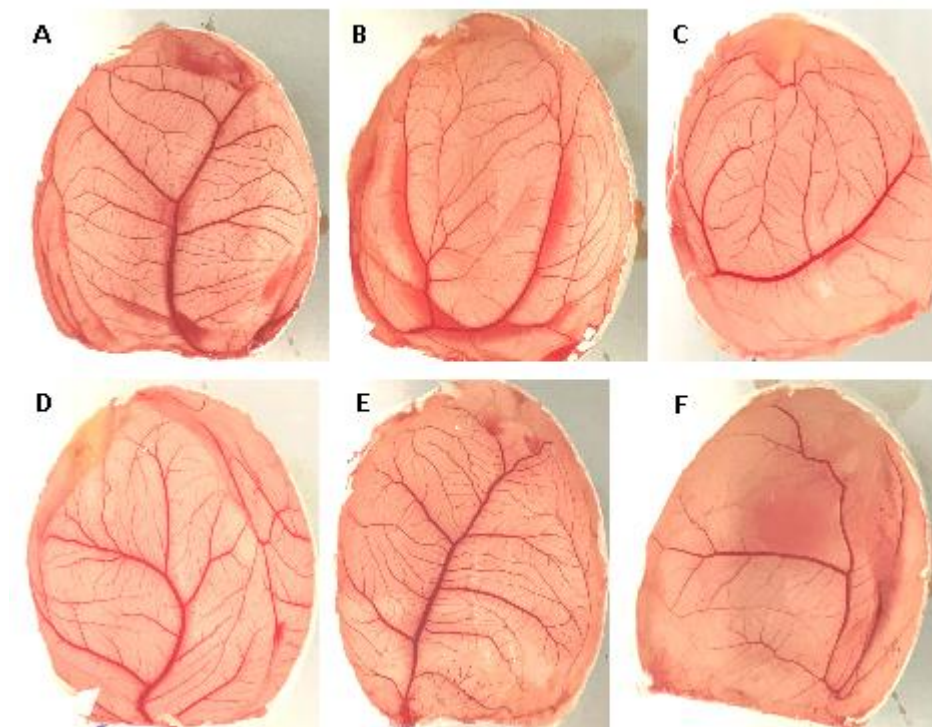
Na figura 5B e C é possível verificar a presença dos CdSe-MSQDs com 0,4 e 0,9 mmol de selênio no encéfalo dos embriões, indicado pelos pontos vermelhos no interior das células.



**Figura 11:** Imagens do encéfalo de embrião de galinha (HH35) expostos a solução salina (A), CdSe-MSQDs sintetizado com 0,4 mmol (B) e 0,9 mmol (C) de selênio. As fatias do encéfalo (10 μm) foram preparadas em criostato e o núcleo foi marcado com

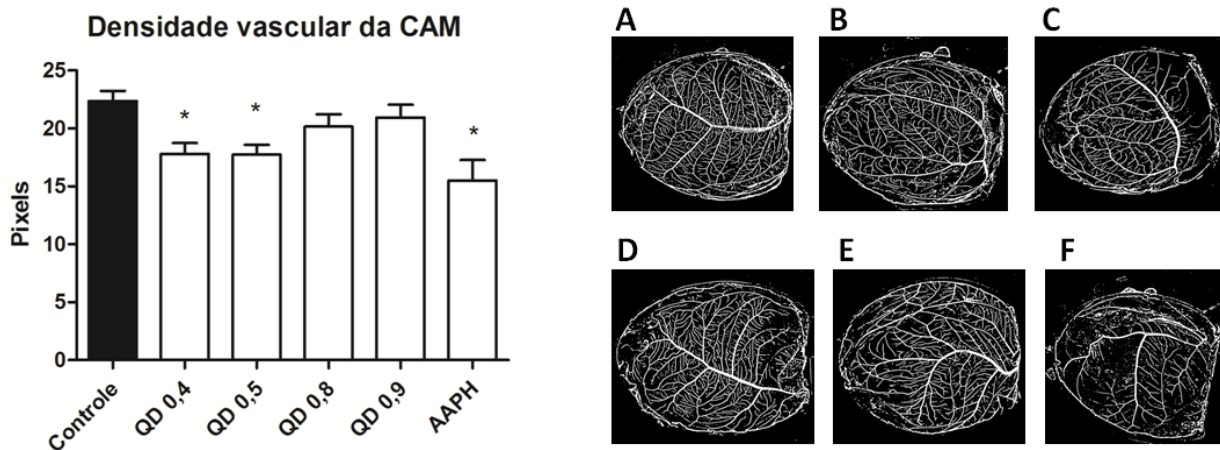
DAPI (azul). O sinal de CdSe-MSQDs (vermelho) foi captado com microscópio de fluorescência (EVOS) x 40.

A figura 6 mostra alterações estruturais na rede vascular da membrana corioalantóide no 10º dia de desenvolvimento embrionário, após injeção de solução salina, CdSe-MSQDs e AAPH em diferentes grupos. As CAMs dos grupos solução salina e CdSe-MSQDs nas concentrações 0,8 e 0,9 mmol de selênio, mostraram-se compatíveis com este estágio de desenvolvimento, ou seja, vasos organizados, com padrão de ramificação em árvore (dendrídrica) e distribuição com ocorrências predominantemente simétricas, respeitando um padrão de hierarquia das ramificações vasculares seqüenciais em relação ao calibre dos vasos e a distância das ramificações. Já as CAMs dos grupos CdSe-MSQDs nas concentrações 0,4 e 0,5 mmol de selênio e AAPH mostraram regiões com pouco brotamento vascular, com vasos com pouca ou sem nenhuma ramificação, indicando alterações no preenchimento da rede capilar, o que foi comprovado quando analisamos a densidade vascular da CAM (figura 7).



**Figura 12:** Morfologia vascular da CAM de embriões de galinha (HH35) expostos a solução salina (A), CdSe-MSQDs sintetizadas em diferentes concentrações de selênio

(QD 0,4 (B); 0,5 (C); 0,8 (D) e 0,9mmol (E) e AAPH (F) (2,20-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride).



**Figura 13:** Densidade dos vasos sanguíneos da CAM de embriões de galinha(HH35) expostos a solução salina (controle negativo), CdSe-MSQDs sintetizadas em diferentes concentrações de selênio (QD 0,4–0,9 mmol) e AAPH 2,2'-azobis (2-amidinopropano). \*  $p < 0,05$  comparado com controle. À direita estão representados o sistema binário da CAM de embriões de galinha(HH35) expostos a solução salina (A), CdSe-MSQDs sintetizadas em diferentes concentrações de selênio (QD 0,4 (B); 0,5 (C); 0,8 (D) e 0,9mmol (E) e AAPH (F) (2,20-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride).

## 5. Discussão

O presente estudo mostrou que a modificação da concentração de selênio durante a síntese de CdSe-MSQDs causou alterações no sistema de defesa antioxidante do encéfalo de embriões de galinha (HH 35). CdSe-MSQD sintetizados na concentração 0,4 mmol de selênio promoveram uma resposta antioxidante do sistema glutatona, SOD e CAT, mas que não foi capaz de evitar o dano oxidativo evidenciado pelo aumento da peroxidação lipídica e diminuição da capacidade antioxidante total no encéfalo dos embriões. Além disso, as CAMs dos embriões expostos a CdSe-MSQDs

sintetizados com menores concentrações de selênio (0,4 e 0,5 mmol) apresentaram uma menor densidade dos vasos.

Os CdSe-MSQDs utilizados nesse trabalho já foram caracterizados em um trabalho anterior, demonstrando através dos espectros de absorção e fluorescência, características de pontos quânticos de tamanho mágico (12). As maiores concentrações de selênio (0,8 e 0,9 mmol) aumentam a intensidade de fluorescência e diminuem a largura total da banda a metade do máximo. Isso ocorre porque o selênio reage com o cádmio durante a síntese, atenuando as densidades de defeitos na superfície dos CdSe-MSQDs, o que diminui a quantidade de íons cádmio adsorvidos. Além disso, os CdSe-MSQDs com as menores concentrações de selênio durante a síntese (0,4 e 0,5 mmol) apresentaram citotoxicidade, provavelmente devido a maior concentração de íons cádmio adsorvido na superfície dos CdSe-MSQDs (12).

A análise da peroxidação lipídica *in vitro* utilizando esses CdSe-MSQDs sintetizados com menores concentrações de selênio (0,4 e 0,5 mmol), ou seja com maior quantidade de cádmio adsorvidos em sua superfície apresentaram aumento da peroxidação lipídica quando comparado ao controle. Outro estudo atribuiu a citotoxicidade de pontos quânticos a base de cádmio a liberação desses íons na célula (22). A exposição a íons cádmio leva a um aumento do estresse oxidativo (66, 123, 124) por vias indiretas de aumento de ROS, como a indução de NADPH oxidases através da ligação com grupos tiol e pela substituição de metais de seu sítio ativo (13).

A partir desses resultados *in vitro*, utilizamos o modelo de embriões de galinha para elucidar como os CdSe-MSQDs influenciam o sistema de defesa antioxidante. No encéfalo dos embriões expostos a CdSe-MSQDs com 0,4 mmol de selênio foi observado uma maior ativação do sistema de defesa glutatona evidenciado pelo maior consumo de GSH e maior atividade de GPX e GR. Esses dados corroboram com um estudo que também observou uma relação GPX/GSH aumentada no encéfalo de pintinho expostos a acrilamida, um potente neurotóxico, no terceiro dia de desenvolvimento embrionário (125).

Além disso, os íons cádmio apresentam alta afinidade pelos grupos tióis, ou seja, a GSH é um alvo primário para esses íons, o que pode ter contribuído para depleção de GSH no encéfalo dos embriões expostos a CdSe-MSQDs com 0,4 mmol de selênio. Isso também explica o fato dos embriões expostos a CdSe-MSQDs sintetizados com 0,5 mmol de selênio mostrarem uma diminuição da GSH apesar de

não terem apresentado alteração na peroxidação lipídica e na capacidade antioxidante total. Esses dados reforçam que a depleção de GSH tem um papel importante na indução do estresse oxidativo causado pelos íons cádmio liberados pelos CdSe-MSQDs.

O grupo exposto a CdSe-MSQDs com 0,4 mmol de selênio, apresentou aumento da atividade das enzimas CAT e SOD. Estudos tem demonstrado que a regulação positiva de genes relacionados a expressão de enzimas antioxidantes como a SOD e CAT pode ser um indicador de estresse oxidativo que ocorre devido a exposição a nanopartículas(91, 126). Outro trabalho que analisou o efeito neurotóxico da acrilamida em embrião observou um aumento da SOD e CAT no hipotálamo dos pintinhos, indicando uma resposta ao aumento da produção de ROS (125).

No encéfalo dos embriões expostos a CdSe-MSQDs com 0,4 mmol de selênio foi observado uma diminuição da capacidade antioxidante total e aumento da peroxidação lipídica. Outro estudo também apresentou essas alterações para evidenciar acitotoxicidade de nanopartícula sem encéfalo de embrião de galinhas (127). Os tecidos cerebrais são geralmente considerados sensíveis à peroxidação e modificação oxidativa devido ao alto conteúdo de ácidos graxos insaturados e atividade antioxidante insuficiente em relação a outros tecidos, tornando-os mais vulneráveis ao dano oxidativo (92, 128).

A partir dos dados da microscopia eletrônica de fluorescência, observamos a presença dos CdSe-MSQDs no encéfalo dos embriões de galinha, indicando que os mesmos podem atuar diretamente nas células causando os danos oxidativos observados. Um trabalho conduzido por Liu, et. al. mostrou a presença de pontos quânticos de CdSe no tecido cerebral de ratos, e concluiu que os mesmos são capazes de atravessar a barreira hematoencefálica (129).

Os CdSe-MSQDs com 0,4 e 0,5 mmol de selênio causaram uma diminuição da densidade vascular na CAM dos embriões, provavelmente induzido pela liberação parcial de íons cádmio no local. A CAM dos embriões expostos a CdSe-MSQDs com 0,8 e 0,9 mmol de selênio não apresentaram diferença em relação ao controle, uma vez que possuem menores concentrações de íons cádmio.

Na CAM dos embriões expostos a AAPH foram observados alterações morfológicas evidentes. A aplicação do AAPH na câmara de ar gera uma liberação acentuada de ROS tendo a CAM como primeiro alvo, gerando uma alteração do padrão de vascularização (130). O estresse oxidativo na CAM pode levar a danos no DNA e

aumento de apoptose das células endoteliais, levando a diminuição da densidade dos vasos sanguíneos.

Em resposta ao estresse oxidativo gerado pelo AAPH observamos uma estimulação do sistema glutaciona no encéfalo dos embriões desse grupo, apesar de não ter apresentado alteração na peroxidação lipídica e na capacidade antioxidante total. Outros trabalhos mostraram aumento da peroxidação lipídica no coração de embriões expostos a AAPH (115), provavelmente os efeitos danosos do AAPH como a rápida geração de radicais peroxil, afetam primeiramente o sistema cardiovascular. Esse achado pode indicar que AAPH, prejudica o encéfalo dos embriões de maneira indireta, devido ao dano gerado primeiramente na vascularização da CAM.

Os resultados, em conjunto, do aumento da atividade das enzimas catalase, SOD, GPx e GR, depleção dos níveis de GSH, diminuição da capacidade antioxidante total e aumento da peroxidação lipídica no encéfalo dos embriões, além da diminuição da densidade vascular da CAM, mostram um evidente desequilíbrio no sistema de defesa antioxidante e consequente aumento do estresse oxidativo causado por exposição aos CdSe-MSQDs com menores concentrações de selênio.

## **6. Conclusão**

Nossos resultados mostraram que o CdSe-MSQDs sintetizados com baixa concentração (0,4 mmol) de selênio afetaram o sistema de defesa antioxidante no encéfalo, levando a um aumento da peroxidação lipídica. Além disso, a vascularização das CAMs, nos grupos 0,4 e 0,5 mmol de Se, foi prejudicada. As maiores concentrações de selênio (0,8 e 0,9 mmol) diminuíram a quantidade de íons cádmio adsorvidos na superfície dos CdSe-MSQDs e não houve dano aos embriões desses grupos. Esses achados reforçam a importância de novas rotas sintéticas para a produção de nanomateriais com menor toxicidade, visando a sua utilização segura em sistemas biológicos. O presente estudo também forneceu um novo modelo, utilizando nanopartículas como indutoras de estresse em encéfalo de embrião de galinha, como uma alternativa para modelos animais e celulares, podendo ser utilizado para testes de pequenas moléculas e drogas que possuem atividades anti-oxidantes.

## 7. Referências

1. Michalet X, Pinaud F, Bentolila L, Tsay J, Doose S, Li J, et al. Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics. *science*. 2005;307(5709):538-44.

<https://doi.org/10.1126/science.1104274>

2. Dubertret B, Skourides P, Norris DJ, Noireaux V, Brivanlou AH, Libchaber A. In vivo imaging of quantum dots encapsulated in phospholipid micelles. *Science*. 2002;298(5599):1759-62.

<https://doi.org/10.1126/science.1077194>

3. Alivisatos P. The use of nanocrystals in biological detection. *Nature biotechnology*. 2004;22(1):47.

<https://doi.org/10.1038/nbt927>

4. Zhang X, Guo Q, Cui D. Recent advances in nanotechnology applied to biosensors. *Sensors (Basel, Switzerland)*. 2009;9(2):1033-53.

<https://doi.org/10.3390/s90201033>

5. Jiang P, Zhu CN, Zhang ZL, Tian ZQ, Pang DW. Water-soluble Ag(2)S quantum dots for near-infrared fluorescence imaging in vivo. *Biomaterials*. 2012;33(20):5130-5.

<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.03.059>

6. Jennings TL, Triulzi RC, Tao G, St Louis ZE, Becker-Catania SG. Simplistic attachment and multispectral imaging with semiconductor nanocrystals. *Sensors (Basel, Switzerland)*. 2011;11(11):10557-70.

<https://doi.org/10.3390/s111110557>

7. Tahara K, Fujimoto S, Fujii F, Tozuka Y, Jin T, Takeuchi H. Quantum Dot-Loaded Liposomes to Evaluate the Behavior of Drug Carriers after Oral Administration. *Journal of pharmaceutics*. 2013;2013:848275.

<https://doi.org/10.1155/2013/848275>

8. Beri RK, Khanna PK, Singh V, Mehta B. "Yellow emitting" magic-size cadmium selenide nanocrystals via a simplified spray pyrolysis method. *Current Applied Physics*. 2011;11(3):809-11.

<https://doi.org/10.1016/j.cap.2010.11.072>

9. Chen X, Samia AC, Lou Y, Burda C. Investigation of the crystallization process in 2 nm CdSe quantum dots. *Journal of the American Chemical Society*. 2005;127(12):4372-5.

<https://doi.org/10.1021/ja0458219>

10. Silva ACA, Deus SLVd, Silva MJB, Dantas NO. Highly stable luminescence of CdSe magic-sized quantum dots in HeLa cells. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2014;191(Supplement C):108-14.

<https://doi.org/10.1016/j.snb.2013.09.063>

11. Hoshino A, Fujioka K, Oku T, Suga M, Sasaki YF, Ohta T, et al. Physicochemical properties and cellular toxicity of nanocrystal quantum dots depend on their surface modification. *Nano Letters*. 2004;4(11):2163-9.

<https://doi.org/10.1021/nl048715d>

12. Almeida Silva AC, Silva MJB, da Luz FAsC, Silva DP, de Deus SLV, Oliveira Dantas N. Controlling the cytotoxicity of CdSe magic-sized quantum dots as a function of surface defect density. *Nano letters*. 2014;14(9):5452-7.

<https://doi.org/10.1021/nl5028028>



13. Cuypers A, Plusquin M, Remans T, Jozefczak M, Keunen E, Gielen H, et al. Cadmium stress: an oxidative challenge. *Biometals*. 2010;23(5):927-40.

<https://doi.org/10.1007/s10534-010-9329-x>

14. Chen J, Han CM, Lin XW, Tang ZJ, Su SJ. [Effect of silver nanoparticle dressing on second degree burn wound]. *Zhonghua wai ke za zhi [Chinese journal of surgery]*. 2006;44(1):50-2.

15. Dorta DJ, Leite S, DeMarco KC, Prado IM, Rodrigues T, Mingatto FE, et al. A proposed sequence of events for cadmium-induced mitochondrial impairment. *Journal of inorganic biochemistry*. 2003;97(3):251-7.

[https://doi.org/10.1016/S0162-0134\(03\)00314-3](https://doi.org/10.1016/S0162-0134(03)00314-3)

16. Lopez E, Arce C, Oset-Gasque MJ, Canadas S, Gonzalez MP. Cadmium induces reactive oxygen species generation and lipid peroxidation in cortical neurons in culture. *Free radical biology & medicine*. 2006;40(6):940-51.

<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.10.062>

17. Halliwell B, Clement MV, Long LH. Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Lett*. 2000;486(1):10-3.

[https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)02197-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)02197-9)

18. Laurent S, Forge D, Port M, Roch A, Robic C, Vander Elst L, et al. Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. *Chemical reviews*. 2008;108(6):2064-110.

<https://doi.org/10.1021/cr068445e>

19. Maynard AD, Baron PA, Foley M, Shvedova AA, Kisin ER, Castranova V. Exposure to carbon nanotube material: aerosol release during the handling of unrefined single-walled carbon nanotube material. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*. 2004;67(1):87-107.

<https://doi.org/10.1080/15287390490253688>

20. Poljak-Blaži M, Jaganjac M, Žarković N. Cell oxidative stress: risk of metal nanoparticles. Handbook of Nanophysics Nanomedicine and Nanorobotics: CRC Press Taylor; 2010.

21. Stone V, Johnston H, Clift MJ. Air pollution, ultrafine and nanoparticle toxicology: cellular and molecular interactions. IEEE transactions on nanobioscience. 2007;6(4):331-40.

<https://doi.org/10.1109/TNB.2007.909005>

22. Chen N, He Y, Su Y, Li X, Huang Q, Wang H, et al. The cytotoxicity of cadmium-based quantum dots. Biomaterials. 2012;33(5):1238-44.

<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.10.070>

23. Donaldson K, Tran L, Jimenez LA, Duffin R, Newby DE, Mills N, et al. Combustion-derived nanoparticles: a review of their toxicology following inhalation exposure. Particle and fibre toxicology. 2005;2(1):10.

<https://doi.org/10.1186/1743-8977-2-10>

24. Probst CE, Zrazhevskiy P, Bagalkot V, Gao X. Quantum dots as a platform for nanoparticle drug delivery vehicle design. Advanced drug delivery reviews. 2013;65(5):703-18.

<https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.036>

25. Hardman R. A toxicologic review of quantum dots: toxicity depends on physicochemical and environmental factors. Environmental health perspectives. 2005;114(2):165-72.

<https://doi.org/10.1289/ehp.8284>

26. Brus LE. Electron-electron and electron-hole interactions in small semiconductor crystallites: The size dependence of the lowest excited electronic state. *The Journal of chemical physics*. 1984;80(9):4403-9.

<https://doi.org/10.1063/1.447218>

27. Michalet X, Pinaud F, Lacoste TD, Dahan M, Bruchez MP, Alivisatos AP, et al. Properties of fluorescent semiconductor nanocrystals and their application to biological labeling. *Single Molecules*. 2001;2(4):261-76.

[https://doi.org/10.1002/1438-5171\(200112\)2:4<261::AID-SIMO261>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/1438-5171(200112)2:4<261::AID-SIMO261>3.0.CO;2-P)

28. Medintz IL, Uyeda HT, Goldman ER, Mattoussi H. Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing. *Nature materials*. 2005;4(6):435.

<https://doi.org/10.1038/nmat1390>

29. Resch-Genger U, Grabolle M, Cavaliere-Jaricot S, Nitschke R, Nann T. Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels. *Nature methods*. 2008;5(9):763-75.

<https://doi.org/10.1038/nmeth.1248>

30. Klarreich E. Biologists join the dots. Nature Publishing Group; 2001.

<https://doi.org/10.1038/35097256>

31. Jovin TM. Quantum dots finally come of age. Nature Publishing Group; 2003.

<https://doi.org/10.1038/nbt0103-32>

32. Taton TA. Bio-nanotechnology: Two-way traffic. *Nature Materials*. 2003;2(2):73.

<https://doi.org/10.1038/nmat824>

33. Bentolila LA, Weiss S. Biological quantum dots go live. *Physics world*. 2003;16(3):23.  
<https://doi.org/10.1088/2058-7058/16/3/35>
34. Uren RF. Cancer surgery joins the dots. *Nature biotechnology*. 2004;22(1):38.  
<https://doi.org/10.1038/nbt0104-38>
35. Chan WC, Maxwell DJ, Gao X, Bailey RE, Han M, Nie S. Luminescent quantum dots for multiplexed biological detection and imaging. *Current opinion in biotechnology*. 2002;13(1):40-6.  
[https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(02\)00282-3](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00282-3)
36. Sutherland AJ. Quantum dots as luminescent probes in biological systems. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*. 2002;6(4):365-70.  
[https://doi.org/10.1016/S1359-0286\(02\)00081-5](https://doi.org/10.1016/S1359-0286(02)00081-5)
37. Watson A, Wu X, Bruchez M. Lighting up cells with quantum dots. *Biotechniques*. 2003;34(2):296-303.  
<https://doi.org/10.2144/03342bi01>
38. Parak WJ, Gerion D, Pellegrino T, Zanchet D, Micheel C, Williams SC, et al. Biological applications of colloidal nanocrystals. *Nanotechnology*. 2003;14(7):R15.  
<https://doi.org/10.1088/0957-4484/14/7/201>
39. Bagwe RP, Zhao X, Tan W. Bioconjugated luminescent nanoparticles for biological applications. *Journal of dispersion science and technology*. 2003;24(3-4):453-64.  
<https://doi.org/10.1081/DIS-120021801>

40. Pellegrino T, Kudera S, Liedl T, Muñoz Javier A, Manna L, Parak WJ. On the development of colloidal nanoparticles towards multifunctional structures and their possible use for biological applications. *Small* (Weinheim an der Bergstrasse, Germany). 2005;1(1):48-63.

<https://doi.org/10.1002/sml.200400071>

41. Smith AM, Duan H, Mohs AM, Nie S. Bioconjugated quantum dots for in vivo molecular and cellular imaging. *Advanced drug delivery reviews*. 2008;60(11):1226-40.

<https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.03.015>

42. Xing Y, Xia Z, Rao J. Semiconductor quantum dots for biosensing and in vivo imaging. *IEEE transactions on nanobioscience*. 2009;8(1):4-12.

<https://doi.org/10.1109/TNB.2009.2017321>

43. Xing Y, Chaudry Q, Shen C, Kong KY, Zhou HE, Chung LW, et al. Bioconjugated quantum dots for multiplexed and quantitative immunohistochemistry. *Nature protocols*. 2007;2(5):1152.

<https://doi.org/10.1038/nprot.2007.107>

44. Liu Z, Cai W, He L, Nakayama N, Chen K, Sun X, et al. In vivo biodistribution and highly efficient tumour targeting of carbon nanotubes in mice. *Nature nanotechnology*. 2007;2(1):47.

<https://doi.org/10.1038/nnano.2006.170>

45. Torchilin VP. Micellar nanocarriers: pharmaceutical perspectives. *Pharmaceutical research*. 2007;24(1):1.

<https://doi.org/10.1007/s11095-006-9132-0>

46. McCarthy JR, Kelly KA, Sun EY, Weissleder R. Targeted delivery of multifunctional magnetic nanoparticles. 2007.

<https://doi.org/10.2217/17435889.2.2.153>

47. Parak WJ, Pellegrino T, Plank C. Labelling of cells with quantum dots. *Nanotechnology*. 2005;16(2):R9.

<https://doi.org/10.1088/0957-4484/16/2/R01>

48. Ballou B, Lagerholm BC, Ernst LA, Bruchez MP, Waggoner AS. Noninvasive imaging of quantum dots in mice. *Bioconjugate chemistry*. 2004;15(1):79-86.

<https://doi.org/10.1021/bc034153y>

49. Xiao Y, Barker PE. Semiconductor nanocrystal probes for human metaphase chromosomes. *Nucleic Acids Research*. 2004;32(3):e28-e.

<https://doi.org/10.1093/nar/gnh024>

50. Liu W, Choi HS, Zimmer JP, Tanaka E, Frangioni JV, Bawendi M. Compact cysteine-coated CdSe (ZnCdS) quantum dots for in vivo applications. *Journal of the American Chemical Society*. 2007;129(47):14530-1.

<https://doi.org/10.1021/ja073790m>

51. Choi HS, Liu W, Misra P, Tanaka E, Zimmer JP, Ipe BI, et al. Renal clearance of nanoparticles. *Nature biotechnology*. 2007;25(10):1165.

<https://doi.org/10.1038/nbt1340>

52. Gao J, Xu B. Applications of nanomaterials inside cells. *Nano Today*. 2009;4(1):37-51.

<https://doi.org/10.1016/j.nantod.2008.10.009>

53. Jiang W, Papa E, Fischer H, Mardiyani S, Chan WC. Semiconductor quantum dots as contrast

agents for whole animal imaging. *TRENDS in Biotechnology*. 2004;22(12):607-9.

<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2004.10.012>

54. Schipper ML, Cheng Z, Lee S-W, Bentolila LA, Iyer G, Rao J, et al. microPET-based biodistribution of quantum dots in living mice. *Journal of Nuclear Medicine*. 2007;48(9):1511-8.

<https://doi.org/10.2967/jnumed.107.040071>

55. Resch-Genger U, Grabolle M, Cavaliere-Jaricot S, Nitschke R, Nann T. Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels. *Nature methods*. 2008;5(9):763.

<https://doi.org/10.1038/nmeth.1248>

56. Doherty GJ, McMahon HT. Mechanisms of endocytosis. *Annual review of biochemistry*. 2009;78:857-902.

<https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.081307.110540>

57. Kim BY, Jiang W, Oreopoulos J, Yip CM, Rutka JT, Chan WC. Biodegradable quantum dot nanocomposites enable live cell labeling and imaging of cytoplasmic targets. *Nano Lett*. 2008;8(11):3887-92.

<https://doi.org/10.1021/nl802311t>

58. Kim JH, Ryu YB, Kang NS, Lee BW, Heo JS, Jeong I-Y, et al. Glycosidase inhibitory flavonoids from *Sophora flavescens*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2006;29(2):302-5.

<https://doi.org/10.1248/bpb.29.302>

59. Nel AE, Madler L, Velegol D, Xia T, Hoek EM, Somasundaran P, et al. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nat Mater*. 2009;8(7):543-57.

<https://doi.org/10.1038/nmat2442>

60. Azzazy HM, Mansour MM, Kazmierczak SC. From diagnostics to therapy: prospects of quantum dots. *Clinical biochemistry*. 2007;40(13-14):917-27.

<https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2007.05.018>

61. Hardman R. A toxicologic review of quantum dots: toxicity depends on physicochemical and environmental factors. *Environmental health perspectives*. 2006;114(2):165-72.

<https://doi.org/10.1289/ehp.8284>

62. Yang RS, Chang LW, Wu JP, Tsai MH, Wang HJ, Kuo YC, et al. Persistent tissue kinetics and redistribution of nanoparticles, quantum dot 705, in mice: ICP-MS quantitative assessment. *Environmental health perspectives*. 2007;115(9):1339-43.

<https://doi.org/10.1289/ehp.10290>

63. Casalino E, Sblano C, Landriscina C. Enzyme activity alteration by cadmium administration to rats: the possibility of iron involvement in lipid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1997;346(2):171-9.

<https://doi.org/10.1006/abbi.1997.0197>

64. Belyaeva EA, Dymkowska D, Więckowski MR, Wojtczak L. Mitochondria as an important target in heavy metal toxicity in rat hepatoma AS-30D cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2008;231(1):34-42.

<https://doi.org/10.1016/j.taap.2008.03.017>

65. Stohs SJ, Bagchi D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free radical biology and medicine*. 1995;18(2):321-36.

[https://doi.org/10.1016/0891-5849\(94\)00159-H](https://doi.org/10.1016/0891-5849(94)00159-H)



66. Valko M, Morris H, Cronin M. Metals, toxicity and oxidative stress. *Current medicinal chemistry*. 2005;12(10):1161-208.

<https://doi.org/10.2174/0929867053764635>

67. Cameron I, McNamee P, Markham A, Morgan R, Wood M. The effects of cadmium on succinate and NADH-linked substrate oxidations in rat hepatic mitochondria. *Journal of Applied Toxicology*. 1986;6(5):325-30.

<https://doi.org/10.1002/jat.2550060505>

68. Early II J, Nonavinakere V, Weaver A. Effect of cadmium and/or selenium on liver mitochondria and rough endoplasmic reticulum in the rat. *Toxicology letters*. 1992;62(1):73-83.

[https://doi.org/10.1016/0378-4274\(92\)90080-4](https://doi.org/10.1016/0378-4274(92)90080-4)

69. Al-Nasser IA, Al-Nasser I. Cadmium hepatotoxicity and alterations of the mitochondrial function. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*. 2000;38(4):407-13.

<https://doi.org/10.1081/CLT-100100950>

70. Tang W, Shaikh ZA. Renal cortical mitochondrial dysfunction upon cadmium metallothionein administration to Sprague-Dawley rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*. 2001;63(3):221-35.

<https://doi.org/10.1080/15287390151101583>

71. Belyaeva EA, Glazunov VV, Korotkov SM. Cd<sup>2+</sup> versus Ca<sup>2+</sup>-produced mitochondrial membrane permeabilization: a proposed direct participation of respiratory complexes I and III. *Chemico-biological interactions*. 2004;150(3):253-70.

<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2004.09.019>

72. Lee W-K, Bork U, Thévenod F. Mitochondria as a target of cadmium nephrotoxicity: induction of swelling and cytochrome c release. *Toxicology mechanisms and methods*. 2004;14(1-2):67-71.

<https://doi.org/10.1080/15376520490257509>

73. Pathak N, Khandelwal S. Oxidative stress and apoptotic changes in murine splenocytes exposed to cadmium. *Toxicology*. 2006;220(1):26-36.

<https://doi.org/10.1016/j.tox.2005.11.027>

74. Belyaeva EA, Dymkowska D, Więckowski MR, Wojtczak L. Reactive oxygen species produced by the mitochondrial respiratory chain are involved in Cd<sup>2+</sup>-induced injury of rat ascites hepatoma AS-30D cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. 2006;1757(12):1568-74.

<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2006.09.006>

75. Wang Y, Fang J, Leonard SS, Rao KMK. Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces reactive oxygen species. *Free Radical Biology and Medicine*. 2004;36(11):1434-43.

<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.03.010>

76. Poliandri AH, Machiavelli LI, Quinteros AF, Cabilla JP, Duvilanski BH. Nitric oxide protects the mitochondria of anterior pituitary cells and prevents cadmium-induced cell death by reducing oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*. 2006;40(4):679-88.

<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.09.021>

77. Chatterjee S, Kundu S, Sengupta S, Bhattacharyya A. Divergence to apoptosis from ROS induced cell cycle arrest: effect of cadmium. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2009;663(1-2):22-31.

<https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2008.12.011>

78. Jurczuk M, Brzóška MM, Moniuszko-Jakoniuk J, Gałazyn-Sidorczuk M, Kulikowska-Karpińska E. Antioxidant enzymes activity and lipid peroxidation in liver and kidney of rats exposed to cadmium and ethanol. *Food and chemical toxicology*. 2004;42(3):429-38.

<https://doi.org/10.1016/j.fct.2003.10.005>

79. Yalin S, Comelekoglu U, Bagis S, Sahin NO, Ogenler O, Hatungil R. Acute effect of single-dose cadmium treatment on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in ovariectomized rats. *Ecotoxicology and environmental safety*. 2006;65(1):140-4.

<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.06.006>

80. Casalino E, Calzaretti G, Sblano C, Landriscina C. Molecular inhibitory mechanisms of antioxidant enzymes in rat liver and kidney by cadmium. *Toxicology*. 2002;179(1-2):37-50.

[https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(02\)00245-7](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(02)00245-7)

81. Mates J. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*. 2000;153(1-3):83-104.

[https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(00\)00306-1](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(00)00306-1)

82. Gong P, Chen FX, Ma GF, Feng Y, Zhao Q, Wang R. Endomorphin 1 effectively protects cadmium chloride-induced hepatic damage in mice. *Toxicology*. 2008;251(1-3):35-44.

<https://doi.org/10.1016/j.tox.2008.07.051>

83. Tandon S, Singh S, Prasad S, Khandekar K, Dwivedi V, Chatterjee M, et al. Reversal of cadmium induced oxidative stress by chelating agent, antioxidant or their combination in rat. *Toxicology letters*. 2003;145(3):211-7.

[https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(03\)00265-0](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(03)00265-0)

84. Ognjanovic B, Pavlovic S, Maletic S, Zikic R, Stajin AS, Radojicic R, et al. Protective influence of vitamin E on antioxidant defense system in the blood of rats treated with cadmium. *Physiological Research*. 2003;52(5):563-70.

<https://doi.org/10.33549/physiolres.930359>

85. Dickinson DA, Forman HJ. Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochemical pharmacology*. 2002;64(5-6):1019-26.

[https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(02\)01172-3](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(02)01172-3)

86. Thévenod F. Nephrotoxicity and the proximal tubule. *Nephron Physiology*. 2003;93(4):p87-p93.

<https://doi.org/10.1159/000070241>

87. Li N, Xia T, Nel AE. The role of oxidative stress in ambient particulate matter-induced lung

diseases and its implications in the toxicity of engineered nanoparticles. *Free radical biology & medicine*. 2008;44(9):1689-99.

<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.01.028>

88. Huang CC, Aronstam RS, Chen DR, Huang YW. Oxidative stress, calcium homeostasis, and altered gene expression in human lung epithelial cells exposed to ZnO nanoparticles. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*. 2010;24(1):45-55.

<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.09.007>

89. Buzea C, Pacheco, II, Robbie K. Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. *Biointerphases*. 2007;2(4):Mr17-71.

<https://doi.org/10.1116/1.2815690>

90. Manke A, Wang L, Rojanasakul Y. Mechanisms of nanoparticle-induced oxidative stress and toxicity. *BioMed research international*. 2013;2013:942916.

<https://doi.org/10.1155/2013/942916>

91. Shvedova AA, Pietroiusti A, Fadeel B, Kagan VE. Mechanisms of carbon nanotube-induced toxicity: focus on oxidative stress. *Toxicology and applied pharmacology*. 2012;261(2):121-33.

<https://doi.org/10.1016/j.taap.2012.03.023>

92. Butterfield DA, Castegna A, Lauderback CM, Drake J. Evidence that amyloid beta-peptide-induced lipid peroxidation and its sequelae in Alzheimer's disease brain contribute to neuronal death. *Neurobiology of aging*. 2002;23(5):655-64.

[https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(01\)00340-2](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(01)00340-2)

93. Floyd RA, Carney JM. Free radical damage to protein and DNA: mechanisms involved and relevant observations on brain undergoing oxidative stress. *Annals of neurology*. 1992;32 Suppl:S22-7.

<https://doi.org/10.1002/ana.410320706>

94. Lu SC. Regulation of glutathione synthesis. *Molecular aspects of medicine*. 2009;30(1-2):42-59.

<https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.05.005>

95. Fukai T, Folz RJ, Landmesser U, Harrison DG. Extracellular superoxide dismutase and

cardiovascular disease. *Cardiovascular research*. 2002;55(2):239-49.

[https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(02\)00328-0](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(02)00328-0)

96. Sharma HS, Ali SF, Hussain SM, Schlager JJ, Sharma A. Influence of engineered nanoparticles from metals on the blood-brain barrier permeability, cerebral blood flow, brain edema and neurotoxicity. An experimental study in the rat and mice using biochemical and morphological approaches. *Journal of nanoscience and nanotechnology*. 2009;9(8):5055-72.

<https://doi.org/10.1166/jnn.2009.GR09>

97. Bondy SC, LeBel CP. The relationship between excitotoxicity and oxidative stress in the central nervous system. *Free Radic Biol Med*. 1993;14(6):633-42.

[https://doi.org/10.1016/0891-5849\(93\)90144-J](https://doi.org/10.1016/0891-5849(93)90144-J)

98. Cadenas E, Davies KJ. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med*. 2000;29(3-4):222-30.

[https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(00\)00317-8](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00317-8)

99. Sies H. Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem*. 1993;215(2):213-9.

<https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1993.tb18025.x>

100. Del Maestro RF. An approach to free radicals in medicine and biology. *Acta Physiol Scand Suppl*.

1980;492:153-68.

101. Reiter RJ, Tan DX, Osuna C, Gitto E. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. A review. *J Biomed Sci*. 2000;7(6):444-58.

<https://doi.org/10.1007/BF02253360>

102. Kaul N, Siveski-Iliskovic N, Thomas TP, Hill M, Khaper N, Singal PK. ProbucoI improves antioxidant activity and modulates development of diabetic cardiomyopathy. *Nutrition*. 1995;11(5 Suppl):551-4. 103. Kaul N, Siveski-Iliskovic N, Hill M, Khaper N, Seneviratne C, Singal PK. ProbucoI treatment reverses antioxidant and functional deficit in diabetic cardiomyopathy. *Mol Cell Biochem*. 1996;160- 161:283-8.

<https://doi.org/10.1007/BF00240060>

104. Ozansoy G, Akin B, Aktan F, Karasu C. Short-term gemfibrozil treatment reverses lipid profile and peroxidation but does not alter blood glucose and tissue antioxidant enzymes in chronically diabetic rats. *Mol Cell Biochem*. 2001;216(1-2):59-63.

<https://doi.org/10.1023/A:1011000327529>

105. Rauscher FM, Sanders RA, Watkins JB, 3rd. Effects of coenzyme Q10 treatment on antioxidant pathways in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *J Biochem Mol Toxicol*. 2001;15(1):41-6. 106. Rauscher FM, Sanders RA, Watkins JB, 3rd. Effects of piperine on antioxidant pathways in tissues from normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *J Biochem Mol Toxicol*. 2000;14(6):329-34.

[https://doi.org/10.1002/1099-0461\(2000\)14:6<329::AID-JBT5>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/1099-0461(2000)14:6<329::AID-JBT5>3.0.CO;2-G)

107. Aragno M, Tamagno E, Gatto V, Brignardello E, Parola S, Danni O, et al. Dehydroepiandrosterone protects tissues of streptozotocin-treated rats against oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 1999;26(11- 12):1467-74.

[https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(99\)00012-X](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(99)00012-X)

108. Martim AC, Sanders RA, Watkins JB. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol*. 2003;17(1):24-38.

<https://doi.org/10.1002/jbt.10058>

109. Vasconcelos SML, Goulart MOF, Moura JBdF, Manfredini V, Benfato MdS, Kubota LT. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Química Nova*. 2007;30:1323-38.

<https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000500046>

110. Halliwell B, Gutteridge JM. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* 1990;186:1-85.

[https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86093-B](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86093-B)

111. Genet S, Kale RK, Baquer NZ. Alterations in antioxidant enzymes and oxidative damage in experimental diabetic rat tissues: effect of vanadate and fenugreek (*Trigonella foenum graecum*). *Mol Cell Biochem.* 2002;236(1-2):7-12.

112. Russell AP, Gastaldi G, Bobbioni-Harsch E, Arboit P, Gobelet C, Deriaz O, et al. Lipid peroxidation in skeletal muscle of obese as compared to endurance-trained humans: a case of good vs. bad lipids? *FEBS Lett.* 551. Netherlands2003. p. 104-6.

[https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)00875-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00875-5)