

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

**PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR
E ESTRUTURAL APLICADAS**

A exposição embrionária-larval de *Drosophila melanogaster* ao estresse oxidativo causado por 2,2'-azobis-2-amidinopropano e nanopartículas de pontos quânticos de seleneto de cádmio

Aluno: Renner Mateus Francisco Duarte

Orientador: Profº. Dr. Foued Salmen Espíndola

UBERLÂNDIA - MG

2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR
E ESTRUTURAL APLICADAS

A exposição embrionária-larval de *Drosophila melanogaster* ao estresse oxidativo causado por 2,2'-azobis-2-amidinopropano e nanopartículas de pontos quânticos de seleneto de cádmio

Aluno: Renner Mateus Francisco Duarte

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Biologia Celular
Orientador: Prof. Dr. Foued Salmen Espíndola

UBERLÂNDIA - MG

2023

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

D812 2023	Duarte, Rener Mateus Francisco, 1996- A exposição embrionária-larval de <i>Drosophila melanogaster</i> ao estresse oxidativo causado por 2,2'-azobis-2-amidinopropano e nanopartículas de pontos quânticos de seleneto de cádmio [recurso eletrônico] / Rener Mateus Francisco Duarte. - 2023. Orientador: Foued Salmen Espindola. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.di.2023.114 Inclui bibliografia. 1. Citologia. I. Espindola, Foued Salmen, 1957-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. III. Título. CDU: 576.3
--------------	--

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR
E ESTRUTURAL APLICADAS

A exposição embrionária-larval de *Drosophila melanogaster* ao estresse oxidativo causado por 2,2'-azobis-2-amidinopropano e nanopartículas de pontos quânticos de seleneto de cádmio

Aluno: Rener Mateus Francisco Duarte

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Prof^o. Dr. Foued Salmen Espíndola

Examinadores:

Data da defesa:

Quem se observa, se transforma
Quem se transforma, se encontra
Quem se permite, se expande

AGRADECIMENTOS

Agradeço a vida, a oportunidade de sonhar e experienciar.

Agradeço imensamente a minha família, meus pais e meu irmão por todos os esforços para que eu pudesse concluir mais essa etapa e que me incentivaram de todas as formas neste desafio.

Agradeço aos professores que me inspiraram a entender e caminhar pelo conhecimento. Agradeço ao Professor Doutor Foued Salmen Espindola, por toda a orientação, compreensão, paciência e oportunidade de crescimento e amadurecimento acadêmico-científica.

Agradeço as minhas brilhantes colaborações, que sem vocês não seria possível a realização desse trabalho. Em especial, Serena Malte do Laboratório de Genética por toda disponibilidade e ensinamentos acerca da *Drosophila melanogaster*, e por animar se aventurar em novas metodologias. E, Fernanda Mascarenhas do Laboratório de Morfologia por todo o conhecimento e treinamento em técnicas histológicas e imunohistoquímica, além de todo apoio e amizade.

Agradeço à equipe do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Uberlândia; em especial a Renata Roland Teixeira, Vinícius Bittar e Ana Luíza Borges pela amizade, dedicação e apoio na realização dos experimentos.

Aos órgãos de fomento, a bolsa condida pela FAPEMIG. E pela Universidade Federal de Uberlândia que possibilitaram a execução e manutenção deste trabalho. Agradeço também toda banca examinadora que aceitaram o convite neste início de ano.

Muito obrigado.

Eu sou, eu existo. Isso é certo, mas por quanto tempo?

A saber, por todo o tempo em que eu penso; pois poderia ocorrer que, se eu deixasse de pensar, eu deixaria ao mesmo tempo de ser ou de existir.

Agora eu nada admito que não seja necessariamente verdadeiro: portanto, eu não sou, precisamente falando, senão uma coisa que pensa [...]

Descartes (Segunda meditação, 1641)

RESUMO

Quando ocorre uma grande produção de radicais livres em relação às defesas antioxidantes chamamos de estresse oxidativo, e o excesso dessas substâncias oxidantes apresentam efeitos prejudiciais, como peroxidação lipídica, oxidação de proteínas, além de danos no material genético, podendo contribuir para o desenvolvimento de várias condições patológicas, reduzindo drasticamente a qualidade de vida da população. Por isso, entender melhor o processo pelo qual ocorre a produção de radicais livres, como seus danos e formas de minimizar tais prejuízos é tão importante. Vários fatores contribuem para o estresse oxidativo e o excesso de produção de radicais livres, incluindo dieta, estilo de vida e condições ambientais. O uso da *Drosophila melanogaster* em toxicologia e pesquisa de mecanismos bioquímicos apresenta muitas vantagens devido à capacidade de programar doses controladas, facilidade de avaliar múltiplos marcos de desenvolvimento dentro de um curto ciclo de vida, e a capacidade de estudar um grande número de indivíduos ao mesmo tempo. A exposição pode ser avaliada em estágios de desenvolvimento embrionário, larval, pupal e adulto. Esse trabalho avaliou os efeitos da exposição do 2,2'-azobis-2-amidinopropane e também de pontos quânticos de tamanhos mágicos funcionalizados com cádmio e selênio no desenvolvimento larval (ovo - larva) de *D. melanogaster*, sendo dividido em duas partes. A primeira teve o foco em avaliar os efeitos nas defesas antioxidantes e danos oxidativos das larvas expostas à molécula 2,2'-azobis-2-amidinopropane. Os resultados mostram alterações morfológicas, morte celular e toxicidade. Além disso, foi encontrado um aumento dramático de Malondialdeído e Produtos Proteicos de Oxidação Avançadas, e aumento da atividade da Superóxido Dismutase e Catalase nas larvas expostas ao AAPH, devido este composto solúvel em água e em temperatura fisiológica gerar radicais livres *in vitro*, pois a sua decomposição gera um mol de azoto e dois mols de radicais de carbono. E a segunda etapa, foi investigar os efeitos da exposição embrionária de quantum dots de cádmio e selênio nas larvas de *D. melanogaster*, em relação a marcadores de estresse oxidativo, danos teciduais, apoptose e toxicidade. Nossos resultados mostram que a ingestão oral de Quantum Dot de Seleneto de Cádmio na concentração de 0,3 mg/mL é capaz de gerar danos no intestino médio, reduzir a taxa de eclosão além de aumentar o estresse oxidativo. Nossos resultados indicam um modelo que permite estudar o estresse oxidativo e os danos no sistema gastrointestinal larval, além de poder ser utilizado como ferramenta para triagem de moléculas com potencial antioxidante e protetor.

Palavras-chave: Drosophitoxicologia, Estresse Oxidativo, Modelos Experimentais, Nanopartículas, *Quantum Dots*.

ABSTRACT

When it occurs a large production of free radicals concerning the antioxidant defenses, we call it oxidative stress, and the excess of these oxidizing substances has harmful effects, such as lipid peroxidation and protein oxidation, in addition to damage to the genetic material, which may contribute to the development of several pathological conditions, drastically reducing the quality of life of the population. Therefore, a better understanding of the process by which the production of free radicals occurs, how their damage, and ways to minimize such damage is so important. Several factors contribute to oxidative stress and excess free radical production, including diet, lifestyle, and environmental conditions. The use of *Drosophila Melanogaster* in toxicology and biochemical mechanism research has many advantages due to the ability to implement controlled doses, the ease of assessing multiple developmental milestones within a short life cycle, and the ability to study large numbers of individuals at the same time. Exposure can be assessed at the embryonic, larval, pupal, and adult stages of development. This work evaluated the effects of exposure to 2,2'-azobis-2-amidinopropane and also magic size quantum dots functionalized with cadmium and selenium on larval development (egg-larvae) of *Drosophila Melanogaster*, being divided into two parts. The first focused on evaluating the effects on antioxidant defenses and oxidative damage of larvae exposed to the 2,2'-azobis-2-amidinopropane molecule. The results show morphological changes, cell death, and toxicity. In addition, a dramatic increase in MDA and AOPP was found, and an increase in SOD and CAT activity in larvae exposed to AAPH, because this compound, soluble in water and at physiological temperature, generates free radicals in vitro, as its decomposition generates a mol of nitrogen and two moles of carbon radicals. The carbon radical can combine to produce stable products or react with molecular oxygen to generate peroxy radicals - maintaining a constant rate of free radical production in the developmental environment that can induce oxidative damage. And the second step was to investigate the effects of embryonic exposure to quantum dots of cadmium and selenium in *Drosophila Melanogaster* larvae, to markers of oxidative stress, tissue damage, apoptosis and toxicity. That's results show that the oral ingestion of QD 0.3 mg/mL can damage the midgut, reduce the hatching rate, and increase oxidative stress. Quantum dots have very interesting optical properties and are being used more and more in numerous applications, so understanding their effects on living biological models is very important. Our results indicate a model that allows studying oxidative stress and damage in the development of the embryonic gastrointestinal system, in addition to being capable to be used as a tool for screening molecules with antioxidant and protective potential.

Keywords: Drosophitoxicology, Oxidative Stress, Experimental Models, Nanoparticles, Quantum Dots.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo de Vida <i>Drosophila Melanogaster</i>	20
Figura 2: Efeitos da exposição ao AAPH de desenvolvimento em larvas: ensaio de pupação e emergência de moscas adultas.	31
Figura 3: Níveis de Malondialdeído produzidos por peroxidação lipídica relacionada ao dano oxidativo às membranas.	32
Figura 4: Níveis de Produtos Proteicos de Oxidação Avançadas.....	33
Figura 5: Atividade da enzima superóxido dismutase.....	34
Figura 6: Atividade da enzima catalase.....	35
Figura 7: Capacidade antioxidante total	36
Figura 8: Conteúdo intracelular de ROS.....	37
Figura 9: A função da barreira intestinal de larvas de <i>Drosophila</i> foi avaliada utilizando um corante alimentar azul não absorvente (FD&C azul #1)	39
Figura 10: Cortes histológicos da região do trato gastrointestinal de larvas de <i>Drosophila melanogaster</i> , grupos controle e exposta ao 2,2'-azobis-2-amidinopropane	40
Figura 11: Coloração Imuno-histoquímica de Caspase-3 Clivada de Células do Trato Gastrointestinal e Corpo de Gordura Perivisceral de Larvas Expostas ao 2,2'-azobis-2-amidinopropane.	42
Figura 12: Espectros de Infravermelho com Transformada de Fourier da nanopartícula de quantum dot de CdSe na faixa de 3500 cm^{-1} a 500 cm^{-1}	43
Figura 13: Espectros de FT-Raman do filme de nanopós dispersos de quantum dot de CdSe	44

Figura 14: Em A absorbância e B fluorescência, realizadas em espectrofluorímetro em largo espectro de emissão. Em C, mesmas medidas em 5 concentrações graduais. E D, imagens de microscopia óptica de nanopós dispersos e secos.....45

Figura 15: Efeitos da exposição ao quantum dot de seleneto de cádmio durante o desenvolvimento de *Drosophila*: ensaio de geração de pupas e emergência de moscas adultas.....47

Figura 16. Níveis de Malondialdeído em larvas expostas ao quantum dot de seleneto de cádmio.....48

Figura 17. Níveis de AOPP em larvas de *Drosophila* expostas à concentração de 0,1 mg/mL e 0,3 mg/mL de *quantum dot* CdSe.....49

Figura 18. Atividade da superóxido dismutase de larvas de *Drosophila melanogaster* expostas ao quantum dot de seleneto de cádmio no período desenvolvimental.....50

Figura 19. Atividade da Catalase de larvas de *Drosophila melanogaster* expostas ao quantum dot de seleneto de cádmio no período desenvolvimental.....51

Figura 20. Capacidade Antioxidante Total de larvas de *Drosophila melanogaster* expostas ao quantum dot de seleneto de cádmio no período desenvolvimental.....52

Figura 21. Conteúdo Intracelular de ROS de larvas de *Drosophila melanogaster* expostas ao quantum dot de seleneto de cádmio no período desenvolvimental.....53

Figura 22. Faixa de fenótipos exibidos pelas larvas expostas ao QD CdSE utilizando um corante alimentar azul não absorvente (FD&C azul #1) 54

Figura 23: Coloração Imuno-histoquímica de Caspase-3 Clivada em células do trato gastrointestinal de larvas em 3^o instar expostas ao QD CdSe. 55

Figura 24: Coloração Imuno-histoquímica de Caspase-3 Clivada em Trofócitos Larvais de *Drosophila Melanogaster*.....56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

O ₂ ⁻	Ânion superóxido
AAPH	2 2'-azobis 2-amidinopropane dihydrochloride
CAT	Catalase
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FRAP	<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
iNOS	Óxido nítrico-sintase induzida
MDA	Malondialdeído
NAD ⁺	Dinucleotídeo de nicotinamida adenina
NADH	Dinucleotídeo de nicotinamida adenina reduzido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NF- κB	Fator nuclear <i>kappa</i> B
NO	Óxido nítrico
O ₂	Oxigênio
OH•	Radical hidroxila
ONOO ⁻	Peroxinitrito
PBS	Solução tampão fosfato-salina
SOD	Superóxido dismutase
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
TNF-α	Fator de necrose tumoral- <i>alfa</i>
TPTZ	2,4,6-tripiridil-s-triazina

SUMÁRIO

1. Introdução.....	14
2. Referencial Teorico	15
2.1 Estresse Oxidativo, Defesa Antioxidante e Danos Celulares	15
2.2 Nanomedicina, Nanopartículas e Quantum Dots	18
2.3 Drosophila Melanogaster, Desenvolvimento e Morte Celular	20
3. Objetivos.....	22
4. Metodologia.....	22
4.1 Cepa da mosca	22
4.2. Exposição.	23
4.3. Coleta de larvas em terceiro ínstar.	24
4.4. Preparação de homogeneizado para ensaios bioquímicos.	24
4.5. Tratamentos.	24
4.5.1 2,2'-azobis-2-amidinopropano.	24
4.5.2 Síntese e Caracterização dos Quantum Dot de Selenato de Cádmio.....	24
4.6. Determinação de proteínas totais.....	25
4.7 Marcadores de estresse oxidativo	25
4.7.1 Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico	25
4.7.2 Níveis de Produtos Proteicos de Oxidação Avançadas	26
Atividade Antioxidante	26
4.7.3Atividade Superoxido Dismutase (SOD)	26
4.7.4Atividade da catalase (CAT)	26
4.7.5 Capacidade Antioxidante Total (FRAP).....	27
4.7.6 Conteúdo Intracelular de ROS (DCFH-DA)	27
4..8 Histologia.....	27
4.8.1 Coloração por Hematoxilina e Eosina	28
4.8.2 Imunohistoquímica	28
4.9 Ensaio Smurf	29
4.11Análise Estatística	29
5. Resultados.....	30

Primeira Parte: 2,2'-azobis-2-amidinopropano

5.1 Toxicidade no desenvolvimento embrio-larval	30
5.2 Análise de marcadores de danos oxidativos	30
5.2.1 Peroxidação lipídica	31
5.2.2 Produtos Proteicos de Oxidação Avançadas	32
5.3 Análise de marcadores antioxidantes	33
5.3.1 Atividade Superoxido Dismutase	33
5.3.2 Atividade Catalase	34
5.3.3 Capacidade Antioxidante Total	35
5.3.4 Conteúdo Intracelular de ROS.....	36
5.4 Ensaio Smurf: Permeabilização Intestinal	37
5.5 Análise histológica do trato gastro intestinal e corpo gorduroso.....	38
5.6 Imuno-histoquímica.....	39

Segunda Parte: Pontos quânticos de CdSe

5.7 Síntese e Caracterização dos QDs CdSe.....	42
5.7.1 Infravermelho com Transformada de Fourier	42
5.7.2 Espectroscopia Raman.....	43
5.7.3 Espectroscopia de Absorbância, Fluorescência e Microscopia Óptica.....	44
5.8 Toxicidade no desenvolvimento embrio-larval	45
5.9 Análise de marcadores de dano oxidativo	46
5.9.1 Peroxidação lipídica	46
5.9.2 Produtos Proteicos de Oxidação Avançadas	47
5.10 Avaliação de marcadores antioxidantes	48
5.10.1 Atividade Superoxido Dismutase	48
5.10.2 Atividade Catalase.....	49
5.10.3 Capacidade Antioxidante Total	50
5.10.4 Conteúdo Intracelular de ROS.....	51
5.11 Ensaio Smurf: Permeabilização Intestinal	52
5.12 Imuno-histoquímica	53
6. Discussão.....	56
7. Conclusão	63
8. Referências	64

1. Introdução

O estresse oxidativo é considerado uma consequência de um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e as defesas antioxidantes, e devido ao acúmulo de compostos pró-oxidantes, o estresse oxidativo foi considerado como facilitador de uma variedade de condições patológicas, como diabetes, câncer e doenças neurodegenerativas (Valko et al., 2007). É um importante mediador de danos celulares e estruturais que incluem material genético, proteínas e membranas lipídicas, além disso, a exposição prolongada a fatores pró-oxidantes leva a uma alteração funcional de enzimas-chave na biossinalização e estruturas celulares que causam danos à expressão gênica (SHARIFI-RAD et al., 2020).

Diante da constante exposição dos tecidos às EROs, em condições fisiológicas, o organismo apresenta sistemas antioxidantes. O comprometimento ou saturação desses sistemas são fatores determinantes para o desequilíbrio (TELES, 2015). Em estudos sobre estresse oxidativo, é muito importante selecionar uma fonte adequada de radicais livres. A decomposição de um composto azo solúvel em água, 2,2,-azobis(cloridrato de 2-amidinopropano, AAPH) em temperatura fisiológica gera radicais livres *in vitro* que podem induzir danos ao organismo, sendo frequentemente utilizado no estudo da peroxidação lipídica e para a caracterização de antioxidantes (LIU et al., 2002). A decomposição de AAPH produz uma mole de azoto e duas moles de radicais de carbono. Os radicais de carbono podem se combinar para produzir produtos estáveis ou reagir com o oxigênio molecular para gerar radicais peroxil - mantendo uma taxa constante de produção de radicais livres em solução (LI et al., 2020). É possível expor tanto proteínas, quanto usar modelos vivos em tais estudos.

Drosophila melanogaster é uma pequena mosca da família Drosophilidae (FREIRE-MAIA; PAVAN, 1949) que apresenta grandes vantagens para variados testes biológicas devido a seu rápido ciclo de vida, grande quantidade de informações sobre seu genoma, fácil manipulação laboratorial, pouca exigência nutritiva e baixo custo de manutenção (OLIVEIRA et al., 2007). Esta espécie também tem sido muito utilizada como modelo-biológico para avaliar o efeito tóxico-genético de substâncias nocivas ao genoma, em ensaios *in vivo* e *in vitro*. Com o passar dos anos, esse modelo foi tornando-se mais e mais conhecida no ramo científico. Difundiu-se um modelo multivalente e hoje, na era genômica, ela vem sendo utilizada no entendimento de fenômenos biológicos muito variados, entre eles os processos do desenvolvimento, envelhecimento (SHAPOSHNIKOV et al., 2022), câncer (LESLIE, ROSALIE, KATE., 2021), Alzheimer (CARMO et al., 2021), comportamentos de memória e aprendizagem (LEI, HENDERSON, KELEMAN., 2022) entre tantas outras aplicações.

2. Referencial Teórico

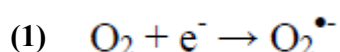
2.1 Estresse Oxidativo, Defesa Antioxidante e Danos Celulares

O estresse oxidativo é definido pela interrupção da homeostase redox pela geração desregulação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e ou a redução mecanismos endógenos de defesa antioxidante (SIES., 2015). Quando presente em baixas concentrações, EROs desempenham uma função crítica na homeostase celular. (CICHOŽ-LACH e MICHALAK., 2014). No entanto, o excesso de EROs causa disfunção celular, peroxidação de proteínas e lipídios, danos ao DNA e, eventualmente, leva a danos celulares irreversíveis e morte.

Por definição, o termo radical livre refere-se a átomos ou moléculas altamente reativos, que contêm número ímpar de elétrons na última camada eletrônica e este não emparelhamento de elétrons da última camada é que lhes confere esta alta reatividade, tornando-os rápidos por retornar ao estado de equilíbrio eletrônico (HALLIWELL e GUTTERIDGE., 1989). Espécies de radicais livres incluem o radical ânion superóxido (O_2^-), radical hidroxila (OH), alcóxila (OR), óxido nítrico (NO) e radicais peróxila (OOR) e também os radicais não livres, que compreendem peróxido de hidrogênio (H_2O_2), dióxido de nitrogênio (NO_2) e peroxinitrito (ONOO), entre outras (SIES e JONES., 2020).

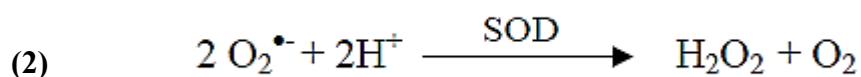
Sob condições patológicas, o excesso de EROs pode resultar na estimulação da sinalização redox patológica que pode causar danos celulares (SIES., 1986) . Devido ao estresse oxidativo produzido durante as condições patológicas e fisiológicas do metabolismo aeróbico, vários compostos orgânicos, como DNAs, lipídios, carboidratos e proteínas, são estruturalmente danificados. Um nível oxidante adequado é mantido por um sistema natural chamado sistema de defesa antioxidante, que atua tanto por processos enzimáticos quanto não enzimáticos (CAMPBELL e COLGAN., 2019).

Quando certas EROs reagem com biomoléculas, ocorre dano oxidativo ou nitrosativo, que pode ser detectado medindo produtos específicos que resultam de tais danos, que chamamos de biomarcadores de danos oxidativos ou nitrosativos (HALLIWELL E GUTTERIDGE., 2015). A adição de um elétron a uma molécula de oxigênio no estado fundamental gera a formação do ânion superóxido.



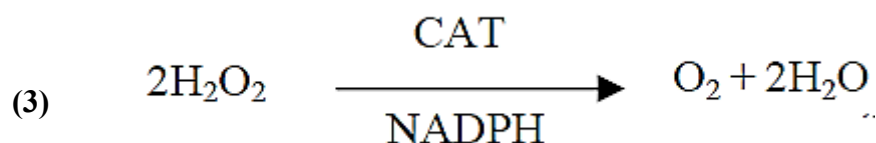
Para proteger-se dos efeitos deletérios de subprodutos do próprio metabolismo celular e também em condições de estresse oxidativo, as células possuem um efetivo sistema de defesa antioxidante endógeno, com componentes enzimáticos e não enzimáticos que visam a proteção pela conversão de EROs em produtos menos nocivos por meio de uma cascata de reações. Entre as defesas enzimáticas, a superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT) são duas importantes enzimas essenciais para a primeira linha de defesa celular contra danos oxidativo (PRUCHNIAK; ARAŽNA; DEMKOW, 2016).

Um desses produtos nocivos gerados nesse processo é o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pode ser gerado por diferentes fontes, incluindo fatores de crescimento, estressores químicos, ou quimiocinas. É mantido em baixas concentrações a uma faixa nanomolecular de 1–100 nm, sendo a molécula central implicada na sinalização celular regulando redox reações; no entanto, a concentração final de H_2O_2 depende dos sistemas de remoção (GIORGIO et al., 2007). O superóxido ao receber mais um elétron e dois íons hidrogênio forma peróxido de hidrogênio (H_2O_2), através do processo chamado dismutação. Essa reação é catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD) que é encontrada em quantidades elevadas nas células de mamíferos e que acelera a reação a 10^4 vezes a frequência para dismutação espontânea num pH fisiológico (ALKADI, 2020).



Atravessa facilmente as membranas por aquaporinas e retém a sinalização redox através de resíduos de cisteína (Cys). H_2O_2 oxida resíduos de Cys em proteínas produtoras de ácido sulfênico (R-SOH). Se a oxidação continua, R-SH é convertido em ácido sulfinico (R-SO₂H) e, posteriormente, se a oxidação continua, para (R-SO₃H) ácido sulfônico (GUPTA e CARROLL., 2014). O mecanismo melhor caracterizado pelo qual o H_2O_2 atuaria como molécula sinalizadora seria por meio da oxidação de resíduos críticos de Cys de proteínas que respondem às alterações no balanço redox (D'AUTRÉAUX; TOLEDANO, 2007).

A CAT é uma proteína heme (EC 1.11.1.6), uma das mais eficientes enzimas conhecidas, faz parte do sistema de defesa antioxidante da maioria dos organismos aeróbios. A evolução desta enzima provavelmente ocorreu quando o planeta Terra passou a ter uma atmosfera oxigenada e os organismos necessitaram neutralizar os subprodutos tóxicos do O₂ (BRAVO et al., 1995). A primeira descrição desta enzima ocorreu em 1900, durante um estudo envolvendo folhas de tabaco, quando a capacidade de metabolizar H₂O₂ foi associada a uma enzima específica, a qual foi denominada catalase (LOEW, 1900). É eficiente em transformar peróxido de hidrogênio em água:



Está presente principalmente em tecidos que possuem no interior de suas células os peroxissomos. Coração, pulmões e cérebro estão mais expostos aos danos provocados pelos radicais livres, pois não possuem peroxissomos. Nestes órgãos o H₂O₂ se difunde para o sangue, onde reage com a CAT eritrocitária e assim é inativado (GOODSELL, 2004).

Assim, uma segunda linha de enzimas de defesa, como GPx e glutathione-S-transferase (GST), aldo-ceto redutase e aldeído desidrogenase (ALDH), são essenciais contra as ERO. A glutathione, um composto molecular tanto na forma reduzida (GSH) quanto na forma oxidada (GSSG), está envolvida atuando como coenzima para várias enzimas e também como substrato para GPx e GST durante o mecanismo de defesa celular contra peroxidação de lipídios e hidrogênio (SADASIVAM et al., 2022). O sistema de defesa antioxidante inclui ainda algumas moléculas endógenas como a albumina, transferrina, ferritina, ácido úrico, bilirrubina e antioxidantes exógenos obtidos da dieta como os flavonóides e vitaminas E e C.

2.2 Nanomedicina, Nanopartículas e *Quantum Dots*

A nanotecnologia é uma indústria em crescimento com ampla gama de aplicações em produtos de consumo e desenvolvimento de tecnologia. No campo biomédico, as nanopartículas estão encontrando uso crescente como agentes de imagem para marcação biomolecular, e direcionamento específico a tecidos. As propriedades físico-químicas das nanopartículas devem ser adaptadas para a aplicação específica. Por exemplo, a estabilidade química e física das nanopartículas no meio biológico (sem oxidação, agregação, aglomeração ou toxicidade) são frequentemente necessárias (ZHENG, MORTENSEN, DELOUISE., 2013). Nanomateriais com pelo menos uma dimensão inferior a 100 nm são basicamente conhecidos como nanopartículas, e existem no meio ambiente, a partir de fontes naturais como atividades vulcânicas, incêndios florestais e/ou provenientes de atividades humanas, como fumo, emissões industriais e consumos tecnológicos (SHI et al., 2001).

O destino e o padrão de distribuição das nanopartículas na natureza ainda não totalmente conhecidas e legisladas e precisam ser examinados, pois as nanopartículas são capazes de atravessar as células e induzir sistemas de defesa (TARRAHI et al., 2019). A utilização de nanopartículas em várias indústrias, como nos segmentos de eletrônica, agricultura, medicina e farmácia, liberam resíduos abundantes, que chegam aos ecossistemas, que podem prejudicar os organismos vivos na água, como as plantas aquáticas e insetos. Portanto, os estudos nanotoxicológicos estão focados não apenas nas características físicas e químicas dos nanomateriais, mas também na saúde dos organismos vivos afetados pelas nanopartículas (FISCHER E CHAN., 2007).

Pontos quânticos (QDs), também conhecidos como nanocristais semicondutores, são uma classe de novos nanomateriais com faixas de diâmetro de 1 a 10 nm (Brunetti et al., 2013). Esses nanocristais são geralmente esféricos ou quase esféricos e contêm elementos pertencentes ao grupo II-VI (CdSe, CdS, CdTe, ZnS, et al.) ou grupo III-V (InP, InAs, Cu₂, InS) (Mattoussi et al., 2000), possuem características ópticas e elétricas únicas, como espectro de emissão estreito e simétrico, tamanho ajustável e composição de material (PANDEY e BODAS., 2020).

Nos últimos anos, a aplicação de QDs em campos biológicos e biomédicos tem sido explorada, e sua faixa de aplicação depende em grande parte da eficácia e toxicologia (STRITAK et al., 2017). Ele foi gradualmente desenvolvido em um novo tipo de sonda fluorescente, trazendo mudanças para imagens biológicas e diagnóstico de doenças (WU et al., 2018). O comprimento de onda de emissão de fluorescência dos QDs cobre toda a região do visível, até mesmo a região do infravermelho, se ajustar seu tamanho e composição. Em comparação com os corantes fluorescentes tradicionais, os QDs têm maior deslocamento de *Stokes*, boa resistência ao fotobranqueamento, intensidade de fluorescência forte, alto rendimento quântico e estabilidade e são apropriados para observação de longo prazo ou em tempo real sob excitação contínua de luz excitante (LI et al., 2018).

Além disso, a capacidade de interagir com proteínas os tornam excelentes marcadores para sistemas com luminescência estável. A estrutura ultra-pequena de CdSe QDs também é um recurso chave, pois as partículas são excretadas através rins. Embora o uso experimental e clínico tem sido atraente, sua potencial toxicidade é um fator que dificulta seu uso, sendo um obstáculo que precisa ser superado (SARAIWA et al., 2022). Devido a potencial toxicidade de metais pesados, a biossegurança de QDs com metais pesados como núcleo: especialmente Cd²⁺ (cádmio), como CdSe (seleneto de cádmio) e CdTe (telureto de cádmio), tem atraído grande atenção dos pesquisadores, embora muito progresso tenha sido feito, a toxicidade potencial dos QDs à base de Cd não foi totalmente elucidada. Portanto, é importante avaliar suas propriedades toxicológicas. É de conhecimento comum que a toxicidade dos QDs está relacionada a muitos fatores, como composição química, tamanho da partícula, estrutura da forma, carga, modificação da superfície e concentração (MANSHIAN et al., 2017; ZHENG et al., 2017; MURASE et al., 2019).

2.3 *Drosophila melanogaster*, Desenvolvimento e Morte Celular

A mosca da fruta, *Drosophila melanogaster* (MEIGEN, 1830) foi estabelecida como uma excelente ferramenta para a pesquisa em uma ampla gama de assuntos, incluindo doenças, desenvolvimento, fisiologia e genética. Graças a uma abundância de ferramentas genéticas, estoques de moscas publicamente disponíveis e bancos de dados, bem como sua semelhança biológica com sistemas de mamíferos, a *Drosophila* se solidificou como um organismo modelo chave para elucidar muitos aspectos da doença humana.

É amplamente utilizado como organismo modelo em genética, bioquímica, biologia celular e biologia do desenvolvimento. Desde as últimas décadas, tem sido utilizado como modelo para elucidar doenças humanas, e de forma incipiente para estudos toxicológicos (BANGI, 2020). Como um inseto holometábolo, sofre várias mudanças drásticas no plano corporal ao longo de sua vida. Progredindo de ovo (embrião), larva, pupa e finalmente adulto, cada estágio fornece uma plataforma única para estudar uma ampla variedade de doenças e condições. Além disso, o desenvolvimento desse animal é resultado de uma estreita coordenação entre os sinais dos hormônios, nutrientes e peptídeos semelhantes à insulina (Dilps) que atuam em conjunto para permitir o crescimento fisiológico adequado do animal (ALLOCCA; ZOLA; BELLOSTA, 2018).

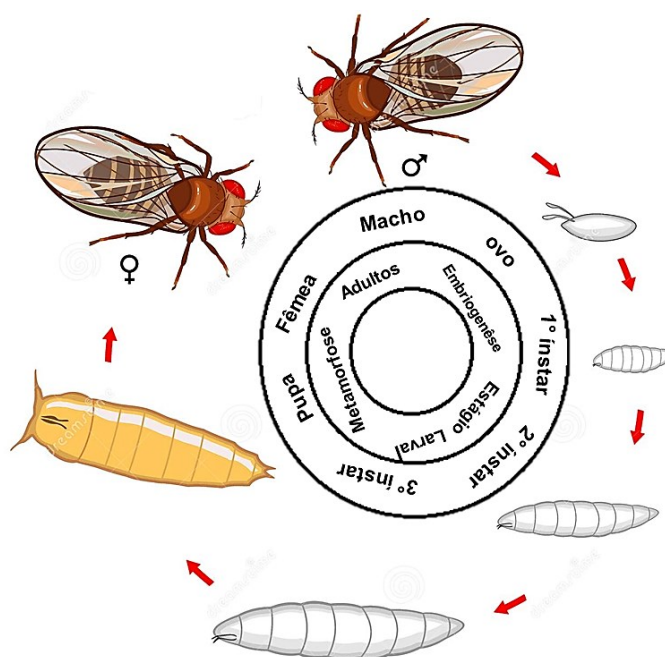


Figura 1- Ciclo de vida *Drosophila melanogaster*

Ao completar o desenvolvimento embrionário, uma larva de primeiro instar eclode do ovo e começa a comer. Nesta fase é necessário que a larva consuma alimentos não apenas para o crescimento, mas também para converter em armazenamento como gorduras e açúcares no corpo gorduroso, de onde será utilizado para sustentar a larva durante a metamorfose. À medida que as larvas crescem, elas trocam seu exoesqueleto por meio de um processo chamado muda. A cada muda, a larva entrará em um novo estágio instar, progredindo por três instares antes de uma muda final para formar uma pupa. O desenvolvimento do embrião ao adulto leva cerca de 10 dias e a vida adulta de 1 a 2 meses (JOHNSON e STOLZING, 2019), permitindo investigações em centenas de descendentes nos estágios juvenil (larva e pupa) ou adulto.

A metamorfose surge durante o estágio de pupa e a maioria das estruturas embrionárias e larvais se degradam durante esse período, enquanto os discos imaginais, que consistem principalmente de células epiteliais indiferenciadas, se diferenciam nos órgãos adultos. Durante essa transição, o animal não consegue se alimentar do ambiente externo e para sobreviver ativa um processo chamado desenvolvimental-autofagia, um mecanismo de sinalização de “autoalimentação” que converte os nutrientes armazenados do corpo gorduroso em nutrientes e macromoléculas necessárias para produzir a energia necessária para a sobrevivência do animal (ANDING E BAEHRECKE, 2015).

Sendo assim, permite um amplo acesso de estudos, principalmente na fase larval apresentando um bom modelo para estudar diferentes tecidos, devido à sua organização celular possui semelhanças à dos mamíferos e funções equivalentes, como a morte celular e processos bioquímicos. Existem várias causas para a morte celular, incluindo estímulos causadas por estresse ou mesmo fatores de transcrição, muito progresso foi feito na compreensão da “apoptose” de *Drosophila*, um termo usado para descrever células mortas que sofrem condensação do volume celular e fagocitose (KORNBLUTH E WHITE., 2005). Semelhante a outros organismos, as vias de morte celular em *D. melanogaster* podem ser ativadas em resposta a danos no DNA e excesso de estresse imposto em vários compartimentos subcelulares por fatores extrínsecos (VASUDEVAN E RYOO, 2016).

Tais estímulos convergem na ativação de três genes pró-apoptóticos (R.H.G.), que antagonizam DIAP-1 (inibidores de proteína apoptótica de mamíferos). Isso leva à formação do apoptossoma pela complexação de Dronc (Caspase-9 de mamífero) com Dark (Apaf-1 de mamífero), iniciando assim uma cascata proteolítica para ativação de caspases executoras, Drice e DCP-1 (Caspase-3/6/de mamífero 7) e, finalmente, levando à apoptose (SHINODA et al., 2019). Como a apoptose de *Drosophila* requer a expressão de antagonistas de IAP, as sequências regulatórias em seu *locus* devem de alguma forma “interpretar” o estresse pró-apoptótico e as vias de sinalização (ZHANG et al., 2008).

3. Objetivo

3.1 Objetivos Gerais

Avaliar os efeitos da exposição do 2,2'-azobis-2-amidinopropane em larvas de *Drosophila melanogaster* em desenvolvimento como um modelo animal alternativo de danos oxidativo.

Avaliar os danos no sistema tratogastrointestinal e atividade antioxidante da ingestão oral do quantum dot de selenato de cádmio no período desenvolvimental de *Drosophila melanogaster*.

3.2 Objetivos Específicos

- a) Toxicidade Desenvolvimental: eclosão ovo-pupa e emergência ovo-adulto.
- b) Danos Oxidativos Estruturais: Produtos Proteicos de Oxidação Avançadas e Peroxidação Lipídica.
- c) Defesa Antioxidante: Atividade Superoxido Dismutase, Catalase, Capacidade Antioxidante Total, e Conteúdo Intracelular de EROs.
- d) Morfologia: Análise Estrutural e Coloração Hematoxilina e Eosina
- e) Imunomarcagem para Caspase-3 Clivada.

4. Metodologia

4.1 Cepa da mosca

Moscas adultas da cepa Canton-S foram utilizadas para obtenção e coleta de ovos para os experimentos. Adultos machos e fêmeas foram colocados em um frasco contendo fundo de ágar e meio enriquecido, após 12 horas os ovos foram recolhidos e contados para serem colocados em novos frascos para se desenvolverem sendo expostos aos tratamentos controle e AAPH 30mM, controle e QD CdSe nas concentrações de 0,1 e 0,3 mg/mL.

4.2 Exposição

O tratamento com moscas foi administrado via alimento e iniciado imediatamente após a oviposição. O AAPH (Sigma-Aldrich, Co LLC, USA) foi preparado diluído em água destilada na concentração final de 30 mM, e então sendo adicionado 5 mL a 1 g de meio enriquecido de purê de batata (75% purê instantâneo, 15% extrato de levedura, 9,3% glicose e 0,07 % nipagina) e, em seguida, adicionados os ovos recém-coletados para desenvolver até L3, onde então serão coletados. Os QDs foram diluídos para concentração final de 0,3 mg e 0,1 por mL e adicionados ao meio enriquecido juntamente com os ovos recém coletados.

4.3 Coleta de larvas em terceiro ínstar

Após 3 dias, os ovos adicionados se desenvolveram em larvas de 3 estágio. As larvas no estágio 3 foram coletadas, lavadas para serem quantificadas, homogeneizadas para os ensaios bioquímicos, inclusão histológica e ensaio de toxicidade. Para toxicidade, foi avaliada a taxa de desenvolvimento de ovos a larvas (eclosão) e da emergência de moscas das pupas formadas.

4.4 Preparação de homogeneizado de larvas para ensaios bioquímicos

As larvas (30 larvas por tratamento; 3 réplicas por grupo) foram homogeneizadas em 1 mL de tampão de homogeneização frio (tampão fosfato de sódio á 0,1 M contendo KCl 0,15 em pH 7,4). O sobrenadante após a centrifugação a 9000 G, durante 10 minutos em 4°C e foi utilizado para a determinação da capacidade antioxidante total (FRAP), ensaio de peroxidação lipídica (LPO), produção de EROs e atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT).

4.5 Tratamentos

4.5.1 2,2'-azobis-2-amidinopropano

O 2,2'-azobis-2-amidinopropano da Sigma-Aldrich foi diluído em água destilada para uma concentração final de 30 mM.

4.5.2 Síntese e Caracterização dos Quantum Dot de Selenato de Cádmio

A síntese dos QDs CdSe foi realizada em soluções coloidais aquosas à temperatura ambiente. Uma solução de NaHSe com y mmol de selênio e 2 mmol de NaBH₄ foi preparado em um balão de três tubuladuras contendo 10 ml de água ultrapura e uma 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(ClO₄)₂·6H₂O, 3 mmol de 1-tioglicerol e 40 ml de água ultrapura. As soluções foram misturadas e submetidas a refluxo por 30 min. Em seguida, os nanopós foram produzidos por centrifugação do coloidal aquoso solução e secagem do precipitado resultante no vácuo. Finalmente, os nanopós de QDs CdSe foram monodispersos em ultrapura água. A caracterização foi realizada com os nanopós dispersos em água ultrapura a uma concentração de estoque de 1mg/ml, e realizado análise exploratória aplicada a espectros de reflexão total atenuada no infravermelho com transformada de Fourier. Espectroscopia Raman sendo obtido os espectros pela LabSpec 6 from HORIBAScientific em 532 nm. Absorbância e Fluorescência foram avaliados no Spectrofluorímetro em uma ampla faixa de infravermelho.

4.6 Determinação de proteínas totais

A concentração de proteínas totais foi medida no tecido larval homogeneizado para normalização das atividades enzimáticas antioxidantes. Com auxílio do homogeneizador de tecidos em tampão fosfato 900µL pH 7,4 50mM EDTA (*ethylenediaminetetraacetic acid*) 5mM, na proporção 1:30 uL (unidade de larva: volume de tampão). A solução foi centrifugada a 10000g durante 15 minutos à 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi coletado e utilizado para as análises de estresse oxidativo e o precipitado descartado.

Em seguida, foi realizada a determinação de proteínas totais do sobrenadante pelo ensaio de Bradford. As proteínas ligam-se ao corante de Bradford (*Comassie Brilliant Blue*) as quais poderão ser quantificadas espectrofotometricamente à 595 nm. Uma solução estoque de soro albumina bovino (BSA) 2mg/mL foi utilizada para a construção da curva padrão (0,1 – 1,4 µg/µL) para a determinação de proteínas das amostras por regressão linear. Tanto a curva como as amostras foram incubadas com o reagente de Bradford em microplaca de 96 poços durante 10 minutos à temperatura ambiente. A leitura espectrofotométrica foi realizada em 595 nm (BRADFORD, 1976).

4.7 Análise do estresse oxidativo

As larvas expostas foram dosadas quanto às defesas antioxidantes, sendo avaliada a atividade do sistema superóxido dismutase e catalase, além da capacidade antioxidante total e conteúdo intracelular de EROs. Além da dosagem de marcadores de danos oxidativos lipídicos e proteicos.

4.7.1 Peroxidação lipídica ou Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Foi utilizado 100 uL de sobrenadante larval, que foi incubado com ácido tricloroacético (TCA 10%) e TBA 0,67%, sendo posteriormente agitadas e aquecidas em banho-maria por 2 horas à 40 °C. Após o resfriamento, as amostras foram diluídas em 5 mL de n-butanol e centrifugadas à 5000xg durante 3 minutos. O sobrenadante foi analisado em fluorescência da fase orgânica a 515 nm_{ex} e 553 nm_{em} (Perkin-Elmer LS 55, Massachusetts, EUA); um valor de fluorescência do branco (de poços sem homogeneizado de coração) foi subtraído de todos os valores de fluorescência. Uma curva padrão de 1,1,3,3- tetrametroxipropano (TMP) em tampão fosfato de sódio com KCl pH 7,4 foi construída para o cálculo de TBARS por regressão linear.

4.7.2 Níveis de Produtos Proteicos de Oxidação Avançadas (AOPP)

Os níveis de AOPPs como marcador de dano oxidativo de proteínas foram medidos por espectrofotometria e resultam principalmente da ação de EROs sobre proteínas, levando à formação de resíduos de ditirosina e reticulação de proteínas. AOPP foi determinada de acordo com o método de (WITKO-SARSAT et al., 1996) usando um espectrofotômetro e calibrado com uma solução de cloramina-T que absorve a 340 nm na presença de iodeto de potássio. Uma amostra de 20µL de homogenato foi misturada com 160µL de PBS (tampão fosfato salino) e 20µL de ácido cítrico. A curva para esta leitura foi feita utilizando cloramina T (curva de 10 a 100 mM) e iodeto de potássio (1,16M). 200µL dos padrões foram misturados com 10µL de iodeto de potássio e 20µL de ácido cítrico e a placa foi agitada por 6 minutos antes da leitura. A absorbância da mistura de reação foi lida a 340 nm. As concentrações de AOPPs foram expressas como $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de equivalentes de cloramina-T.

4.7.3 Atividade Superóxido dismutase (SOD)

O princípio desse ensaio baseia-se na inibição da reação do radical $\bullet\text{O}_2$ com o pirogalol. Como o $\bullet\text{O}_2$ é gerado pela auto-oxidação do pirogalol em meio básico, a SOD presente na amostra compete pelo radical. A auto-oxidação do pirogalol leva a formação de um composto colorido, detectado no espectrofotômetro a 420 nm (MARKLUND; MARKLUND, 1974). As amostras (20 uL) de sobrenadante foram pipetadas na microplaca com 80 U/ml de catalase e 24 mM pirogalol, em tampão Tris-HCl 50 mM (pH 8,2) contendo EDTA 1 mM. A leitura cinética ocorreu em microplacas à 420 nm durante 10 minutos em um intervalo de 15 em 15 segundos.

4.7.4 Atividade Catalase (CAT)

A atividade da catalase foi medida através da degradação do H_2O_2 pela variação de absorbância à 240 nm. Inicialmente, as amostras (10 uL) foram incubadas com 1 uL de Triton-X 10% no gelo por 15 minutos. Em seguida, foi adicionado H_2O_2 a 0,2% em tampão fosfato de potássio 10 mM, pH 7,0. A leitura cinética foi realizada em microplacas específicas para ultravioleta, aplicando um comprimento de onda de 240 nm durante 10 minutos em um intervalo de 15 em 15 segundos (Perkin-Elmer LS 55, Massachusetts, EUA) (AEBI, 1984).

4.7.5 Capacidade Antioxidante Total (FRAP)

As espécies antioxidantes reduzem Fe^{3+} a Fe^{2+} . O ferro presente nas amostras é inicialmente quelado pela 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ), formando um complexo Fe^{2+} -TPTZ. Este complexo é reduzido para a forma ferrosa, provocando uma coloração azul intensa quantificável em um comprimento de onda de 593 nm (Molecular Devices, Menlo Park, CA, EUA) (BENZIE & STRAIN, 1996). Para a análise, os sobrenadantes (10uL) foram incubados com o reagente de FRAP (10 volumes de tampão acetato sódio 0,3 M pH 3,6, 1 volume de solução de TPTZ 10 mM e 1 volume de solução de cloreto férrico 20 mM) à 37 °C durante 10 minutos e, posteriormente submetidos à leitora de microplacas. As concentrações foram obtidas por meio de uma curva padrão de trolox (10 – 200 μM), um análogo da vitamina E, por regressão linear. O valor de absorbância do branco (de poços sem homogeneizado de coração) foi subtraído de todos os valores de absorbância (BENZIE & STRAIN, 1996).

4.7.6 Conteúdo Intracelular de ROS

Espécies reativas foram determinadas em amostras por oxidação de diacetato de 2,7-diclorofluoresceína (DCFH-DA) como um índice geral de produção de ROS (PEREZ-SEVERIANO et al., 2004). Uma mistura contendo as amostras, diacetato de dicloro-dihidro-fluoresceína 10 μM (DCFH-DA) e tampão Tris-HCl 5 mM (pH 7,4) foi incubada por 3 min a 37 °C e a emissão de fluorescência do DCF resultante da oxidação DA foi medida em um comprimento de onda de excitação de 485 nm e um comprimento de onda de emissão de 530 nm.

4.8 Histologia

Após 24 horas de fixação a 4°C, as larvas foram incluídas em parafina; o material passou por desidratação em concentrações crescentes (70, 80, 90 e 100%) de etanol, diafanização em xileno, impregnação e inclusão em parafina ou temperatura de 58° a 60°C para confecção do bloco de parafina. Posteriormente, cortes histológicos transversais de 10 μm de espessura foram realizados em micrótomo (Leica®). Os cortes foram então transferidos para lâminas de vidro gelatinizadas e armazenados em temperatura ambiente até a realização da análise histoquímica.

4.8.1 Coloração de Hematoxilina e Eosina (cortes parafinados)

Cortes transversais de larvas de *D. Melanogaster* foram coradas com hematoxilina e eosina (HE). Primeiramente, o material passou por desparafinização por processos em xileno (15 minutos cada), hidratação em diferentes concentrações de etanol e água (100, 95, 85, 70% etanol, um minuto cada) e água destilada por 5 minutos. Em seguida, foram coradas em solução de hematoxilina de Harris (5g em 50 mL de álcool absoluto, 100g de sulfato de alumínio e potássio, 1 L de água destilada, 2,5g de óxido de mercúrio vermelho e 30mL de ácido acético glacial) por um minuto e, em seguida, lavadas, e também corado em solução de eosina-floxina (1g de eosina Y hidrossolúvel, 1g de floxina B, 200 mL de água destilada, 780mL de etanol 95% e 4 mL de ácido acético glacial) por 2 minutos e 40 segundos, e depois lavado. Por fim, as lâminas foram desidratadas em álcool e diafinizadas em xilol, montadas e fotografadas com câmera digital acoplada a microscópio de luz, no aumento de 100x.

4.8.2 Imuno-histoquímica (cortes parafinados)

Secções transversais de larvas de *D. Melanogaster* primeiro passaram por processos de desparafinização e hidratação conforme descrito acima. Para iniciar a recuperação do antígeno com tampão citrato a 75-80°C por 30 minutos. Após o resfriamento, as lâminas foram lavadas em TBST, e o bloqueio da peroxidase endógena foi feito com metanol com peróxido de hidrogênio 3% por 20 minutos e lavagem com TBST, e o bloqueio proteico com BSA 5% em TBST por uma hora. Em seguida, o anticorpo primário durante a noite foi incubado a 4°C, coelho anti-Caspase (Imuny® 1:300). Após a incubação, as amostras foram lavadas e incubadas com anticorpo secundário conjugado com peroxidase por uma hora. Após lavagem com TBST, as lâminas foram reveladas com DAB por 60 segundos e lavadas em TBST, para posteriormente serem coradas em hematoxilina por 10 segundos e lavadas. Por fim, as lâminas foram desidratadas em álcool e diafinizadas em xilol, montadas e fotografadas com câmera digital acoplada a microscópio de luz, no aumento de 100x.

4.10 Ensaio Smurf

A fim de monitorar o vazamento intestinal foi usado o ensaio Smurf em larvas L3. Portanto, foi adicionado ao meio contendo larvas um corante azul alimentício não tóxico (2 mg/mL) diluída em água (RERA; VALLOT; LEFRANÇOIS, 2018), e no dia seguinte as larvas são coletadas e fotografadas. O ensaio avalia a ingestão alimentar pela co-ingestão de um corante azul, que não é absorvido pelo trato digestivo, permitindo assim a quantificação direta.

4.11 Análise estatística

As análises estatísticas e as figuras foram realizados pelo *software* prisma (GraphPad Software, San Diego Califórnia – EUA), versão 6.0. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média para avaliar a diferença entre os resultados obtidos todas as análises foram realizadas em triplicata. A significância da diferença foi calculada para o ensaio AAPH (2 tratamentos) teste T-student e o QD CdSe (3 tratamentos) Análise de Variância (ANOVA) one-way com o Teste de Múltiplas Comparações Bonferroni's. Será considerado o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS

PARTE 1

A exposição embrionária-larval ao 2,2'-azobis-2-amidinopropano causa danos teciduais, reduz a viabilidade e altera os parâmetros de estresse oxidativo em larvas de terceiro ínstar de *Drosophila*

5.1 Toxicidade no desenvolvimento embrio-larval

As larvas expostas ao AAPH e controle foram avaliadas quanto á toxicidade no desenvolvimento, sendo quantificada a geração de pupas e adultos que se desenvolveram dos ovos adicionados ao meio. Na Figura 2, em a) e b) é possível ver que a exposição a 15 mM de AAPH reduz drasticamente o numero de pupas (19%) e a emergencia de moscas adultas (16,5%) quando comparados ao controle (80%) e (69%) respectivamente. Foi utilizado o dobro dessa concentração, e colocado os ovos para se desenvolverem em 30 mM, como é visto em (Figura 2 C-D) reduz ainda mais a geração de novos individuos adultos (<5%). Essas observações demonstram que a exposição a 15 mM e 30 mM no periodo desenvolvimental causam um efeito bastante toxico as larvas, além desse efeito toxico foi visualizado um atraso de 1 dia para as chegarem em L3, quando comparados com o controle. Foi realizado um ensaio com a dosagem de 70 mM, o que ocasionou uma morte de 100%, não sendo obtida nenhuma pupa nem individuos adultos eclodidos. Devido esses achados, os experimentos seguintes foram realizados apenas com larvas que foram expostas a 30 mM durante o seu desenvolvimento.

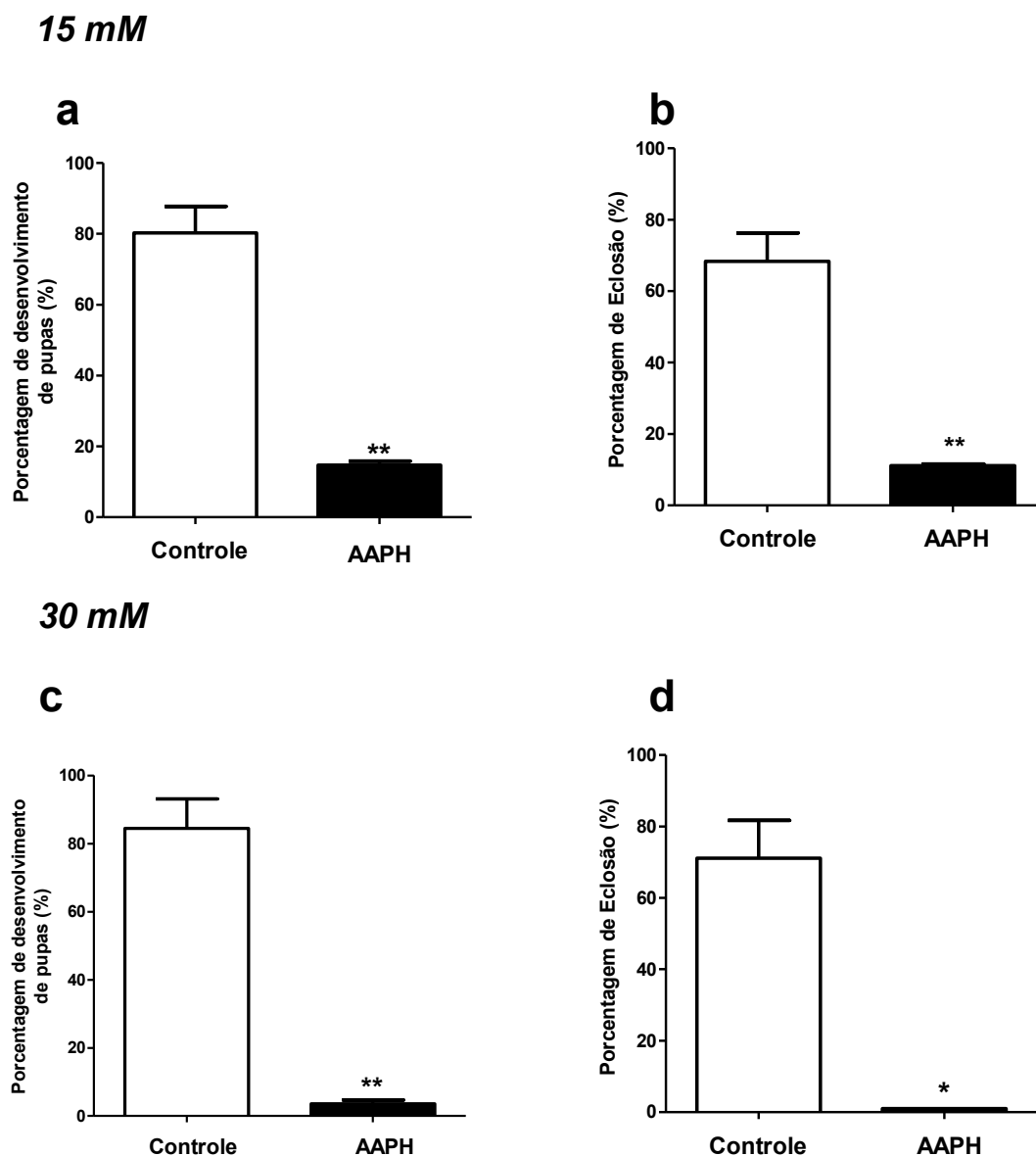


Figura 2. Efeitos da exposição ao AAPH de desenvolvimento em larvas: ensaio de pupação e emergência de moscas adultas. Larvas de *Drosophila* foram expostas à concentração de 15 mM e 30 mM de 2,2'-azobis-2-amidinopropano. Taxa de desenvolvimento de ovos a pupas, **(a)** 15 mM e **(c)** 30 mM. Taxa de emergência de moscas adultas das pupas, **(b)** 15 mM **(d)** e 30 mM. (Média $\pm$ DP, n = 3, 50 ovos por amostra).

5.2 Análise de marcadores de danos oxidativo

5.2.1 Peroxidação lipídica

O malondialdeído (MDA) é um produto final da peroxidação lipídica provocada por danos teciduais. As larvas expostas ao AAPH apresentaram maior peroxidação lipídica em comparação com o grupo controle. A figura a seguir utilizou o grupo não-tratado como controle negativo, definido como grupo usado para comparação que recebeu apenas água destilada. Enquanto que o grupo exposto, destacado na cor preta refere-se as larvas expostas ao AAPH.

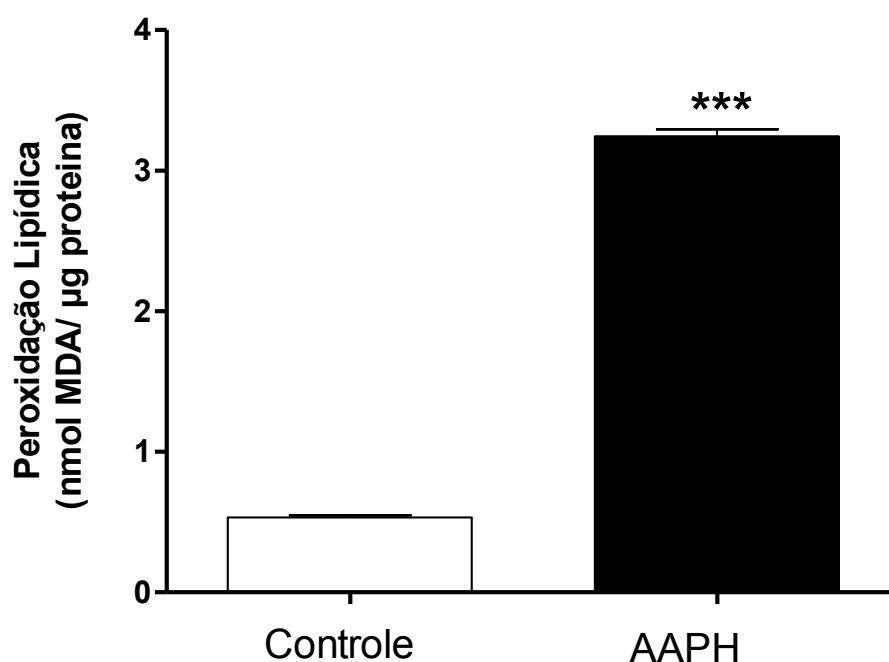


Figura 3. Níveis de Malondialdeído produzidos por peroxidação lipídica relacionada ao dano oxidativo às membranas. Peroxidação lipídica de larvas em L3, grupo controle (água destilada) e grupo exposto a 30 mM de 2,2'-azobis-2-amidinopropano. Teste: t-student. Valores expressos como média $\pm$ erro padrão *** $p < 0,001$ versus grupo controle.

5.2.2 Produtos Proteicos de Oxidação Avançadas

O AOPP (*Advanced Oxidation Protein Products*) é gerado através da ação do estresse oxidativo sobre proteínas e aminoácidos, pela ação de oxidantes e é um importante marcador de dano oxidativo em proteínas. O aumento da formação de AOPP tem sido associado e é reconhecido como um marcador precoce e fator de desenvolvimento para numerosas condições patológicas (KALOUSOVÁ, SKRHA, ZIMA, 2002). As larvas expostas ao AAPH apresentaram maiores níveis de AOPP em L3 comparados com o controle.

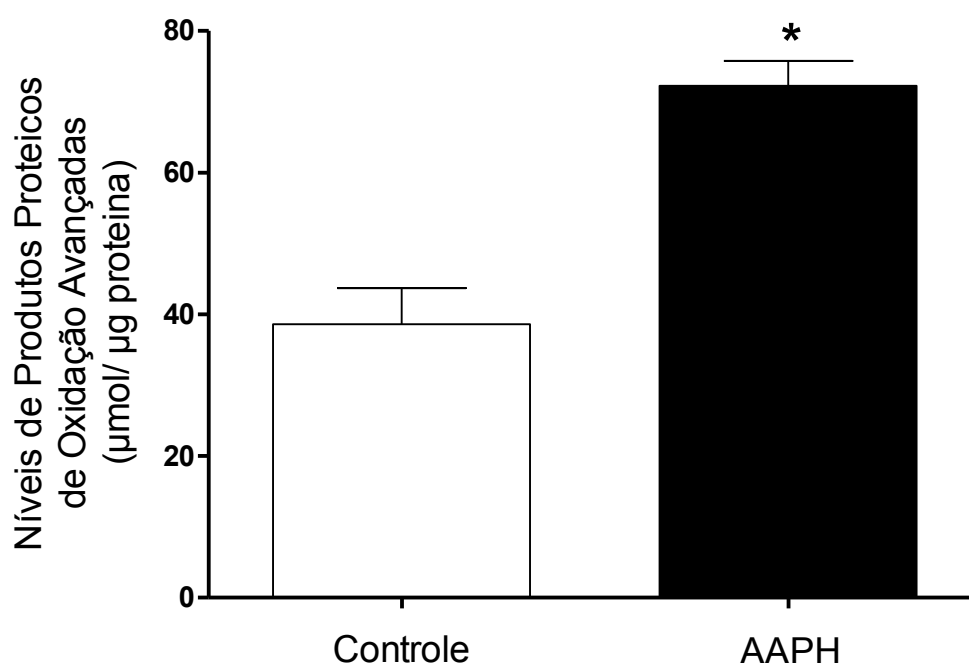


Figura 4. Níveis de Produtos Proteicos de Oxidação Avançada. Níveis de AOPP de larvas em L3, grupo controle (água destilada) e grupo exposto a 30 mM de AAPH. Teste: t-student. Valores expressos como média $\pm$ erro padrão * $p < 0,05$ versus grupo controle.

5.3 Avaliação de marcadores antioxidantes

As larvas expostas ao AAPH e Controle foram avaliadas quanto às defesas antioxidantes, sendo avaliada a atividade do sistema superóxido dismutase e catalase, além da capacidade antioxidante total e conteúdo intracelular de ROS. L3 expostas aos AAPH apresentaram um aumento significativo nas enzimas SOD e CAT, além de um aumento na capacidade antioxidante total e por consequência baixos níveis de ROS intracelular, quando comparados as larvas do grupo controle ($p < 0,05$).

5.3.1 Atividade da Superóxido Dismutase

A enzima SOD participa do primeiro grupo de defesas antioxidantes, conhecidas por serem detoxificadoras, ou seja, agem sobre o composto antes que ele cause lesão. Ela catalisa a reação de dois ânions superóxidos com a formação de peróxido, que é menos reativo e pode ser degradado por outra enzima. As larvas expostas ao AAPH apresentaram atividade aumentada nessa enzima antioxidante de forma significativa comparadas com o controle, demonstrado que os EROs produzidos pelo AAPH no meio são capazes de ativar a defesa antioxidante primária das larvas em L3.

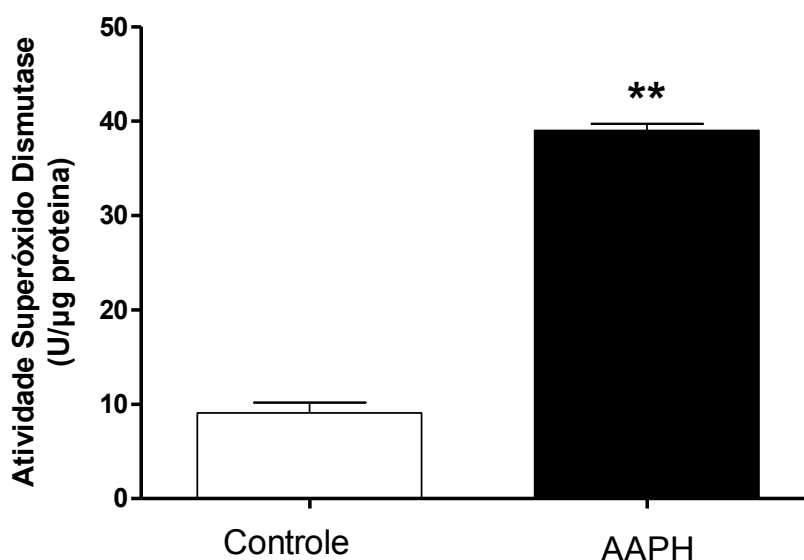


Figura 5. Atividade da Enzima Superóxido Dismutase. Atividade da Superóxido Dismutase (SOD) de larvas do grupo controle (água destilada) e expostas ao AAPH (30 mM). Teste: t-student. Valores expressos como média $\pm$ erro padrão ** $p < 0,01$ versus grupo controle.

5.3.2 Atividade da catalase

A enzima catalase é uma peroxidase, responsável por decompor o peróxido de hidrogênio detoxificando a célula, sua atividade se mostrou aumentada nas larvas expostas ao AAPH quando comparada com o grupo controle.

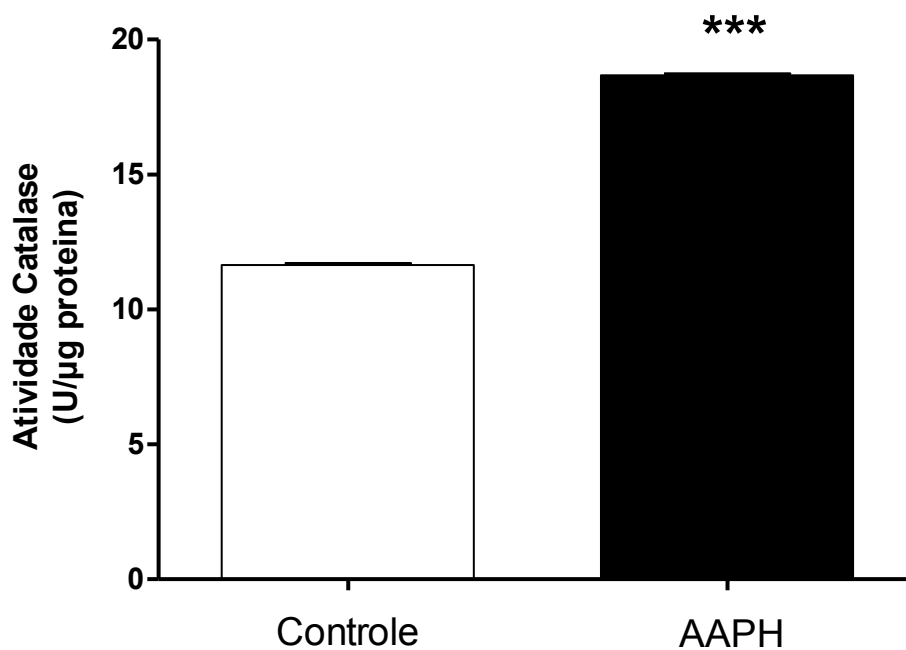


Figura 6. Atividade da enzima Catalase. Atividade da Enzima Catalase (CAT) de larvas do grupo controle (água destilada) e expostas ao AAPH (30 mM). Teste: t-student. Valores expressos como média $\pm$ erro padrão. *** $p < 0,001$ versus grupo controle.

5.3.3 Capacidade Antioxidante Total (FRAP)

A determinação da capacidade antioxidante total se apresentou significativamente maior nas larvas expostas ao AAPH comparada com o grupo controle, demonstrando que a exposição embrionária ao AAPH aumenta capacidade antioxidante como resposta a presença exagerada de EROs, essa capacidade se deve ao aumento nas enzimas antioxidantes. É uma medida muito importante, pois mede o sinergismo dos vários componentes do sistema antioxidante.

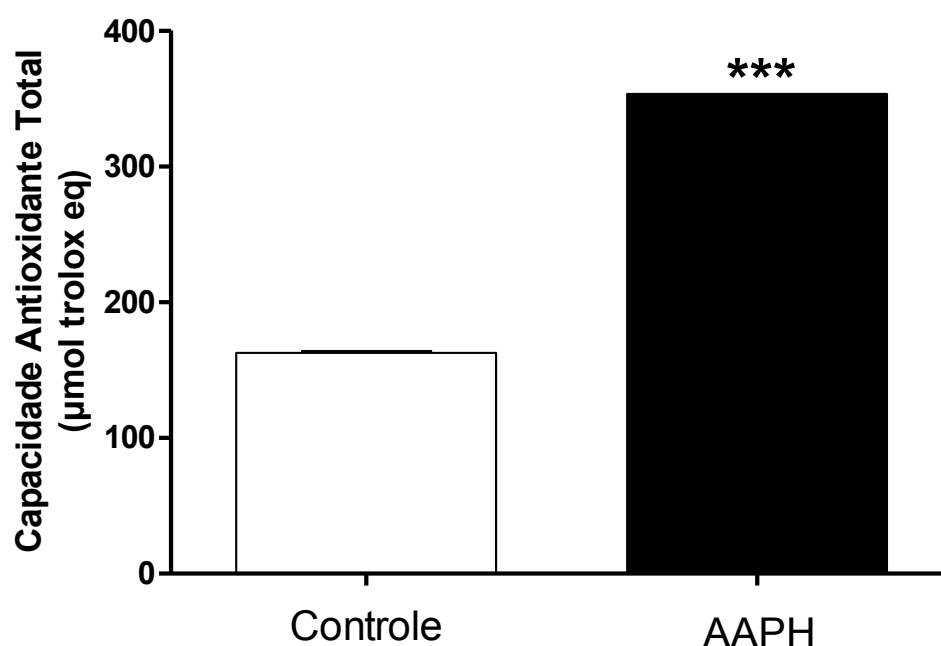


Figura 7. Capacidade Antioxidante Total. Capacidade Antioxidante Total do sobrenadante de larvas do grupo controle (água destilada) e expostas ao AAPH (30 mM). Teste: t-student. Valores expressos como média $\pm$ erro padrão *** $p < 0,001$ versus grupo controle.

5.3.4 Contéudo Intracelular de ROS (DCFH-DA)

E como as defesas antioxidantes se apresentaram significativamente aumentadas, foi mensurada a quantidade de radicais livres presentes nas células. A exposição ao AAPH resultou em uma redução nos níveis de ROS em comparação com os do grupo controle. Esses achados sugeriram que o AAPH desencadeia uma resposta antioxidante elevada, na tentativa de proteger o organismo dos danos oxidativos.

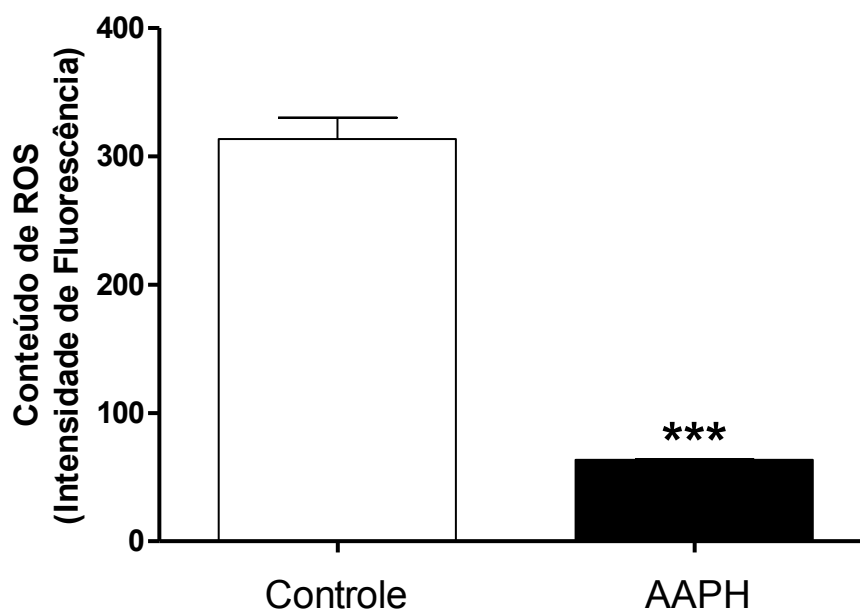


Figura 8. Níveis Intracelulares de ROS. Níveis Intracelulares de ROS do sobrenadante de larvas do grupo controle (água destilada) e expostas ao AAPH (30 mM). Teste: t-student. Valores expressos como média $\pm$ erro padrão *** $p < 0,001$ versus grupo controle.

5.4 Ensaio Smurf: Permeabilização Intestinal

O ensaio smurf (SA) avalia através de a ingestão alimentar pela co-ingestão de um corante azul que não é absorvido pelo trato digestivo, a integridade da barreira intestinal por meio da visualização direta do corpo do organismo. Na Figura 9 é possível visualizar os fenótipos smurfs adquiridos após os tratamentos: em 9A larva do grupo *naive*, 9B larva do grupo controle, 9C larva do grupo exposta a AAPH e em 9D ampliação da região abdominal evidenciando extravasamento do corante azul. O ensaio smurf mostrou que a ingestão oral de AAPH causou um aumento na permeabilidade intestinal e a difusão do corante pelo corpo larval, através de microscopia óptica. Como foi demonstrado que a exposição estava causando permeabilidade intestinal, investigamos a morfologia do trato gastrointestinal da larva exposta, através do processamento histológico.

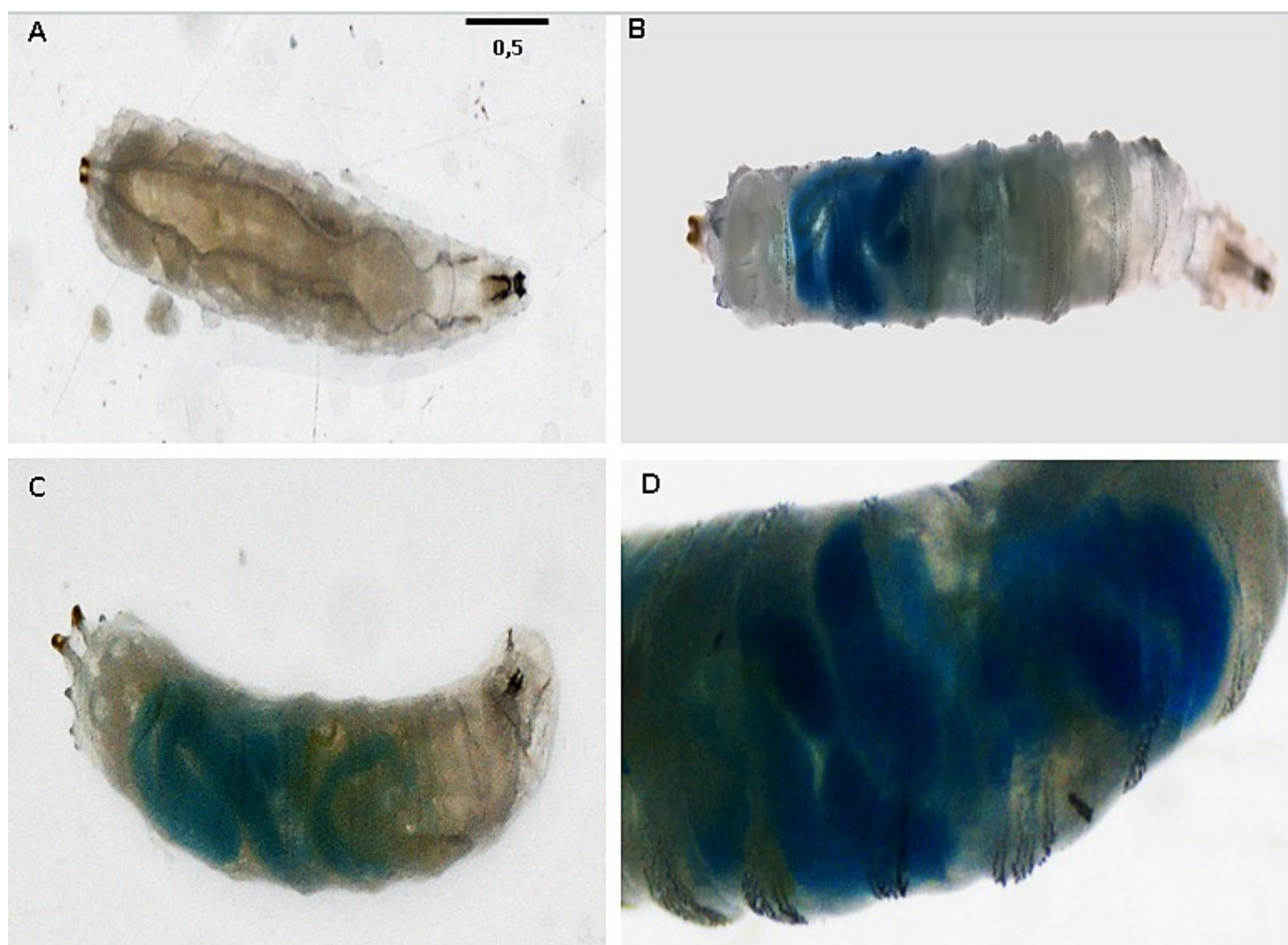


Figura 9. A função da barreira intestinal de larvas de *Drosophila* foi avaliada utilizando um corante alimentar azul não absorvente (FD&C azul #1). Fenótipos exibidos pelas larvas L3 (a) Controle sem corante alimentar azul. (b) Controle com corante alimentício azul. (c) Tratamento de larvas AAPH com corante alimentar azul. (d) Ampliação da região abdominal, mostrando algumas partes do intestino bem marcadas e permeabilizadas pelo azul.

5.5 Análise histológica do trato gastrointestinal e corpo gorduroso larval

Na Figura 10, é mostrado cortes histológicos da região do trato gastrointestinal da larva de terceiro instar de *Drosophila Melanogaster*, controle e exposta ao grupo AAPH. Em (A) é uma visão geral de parte do intestino médio e final mostrando diferentes formas de epitélios. Uma ampliação desta seção (B) é possível notar células unidas e bem distribuídas com uma borda em escova grande e bem definida ao longo do enterócito, e em (C) são células pertencentes ao corpo gorduroso perivisceral, distribuídas em toda extensão periférica da larva e região intestinal. Na imagem podemos ver um grupo de trofócitos, são morfologicamente uniformes, apresentando formato esférico e núcleo pleomórfico com o citoplasma estreito entre muitas inclusões celulares de gotículas lipídicas. Em (D) notamos conteúdos luminais mais proeminentes, (E) células com uma borda em escova menor, células mais espaçadas e com pequenos corpos nucleares periféricos. Em (D) trofócito centralizado visível, com núcleo bem aparente e com menores vacúolos lipídicos no citoplasma.

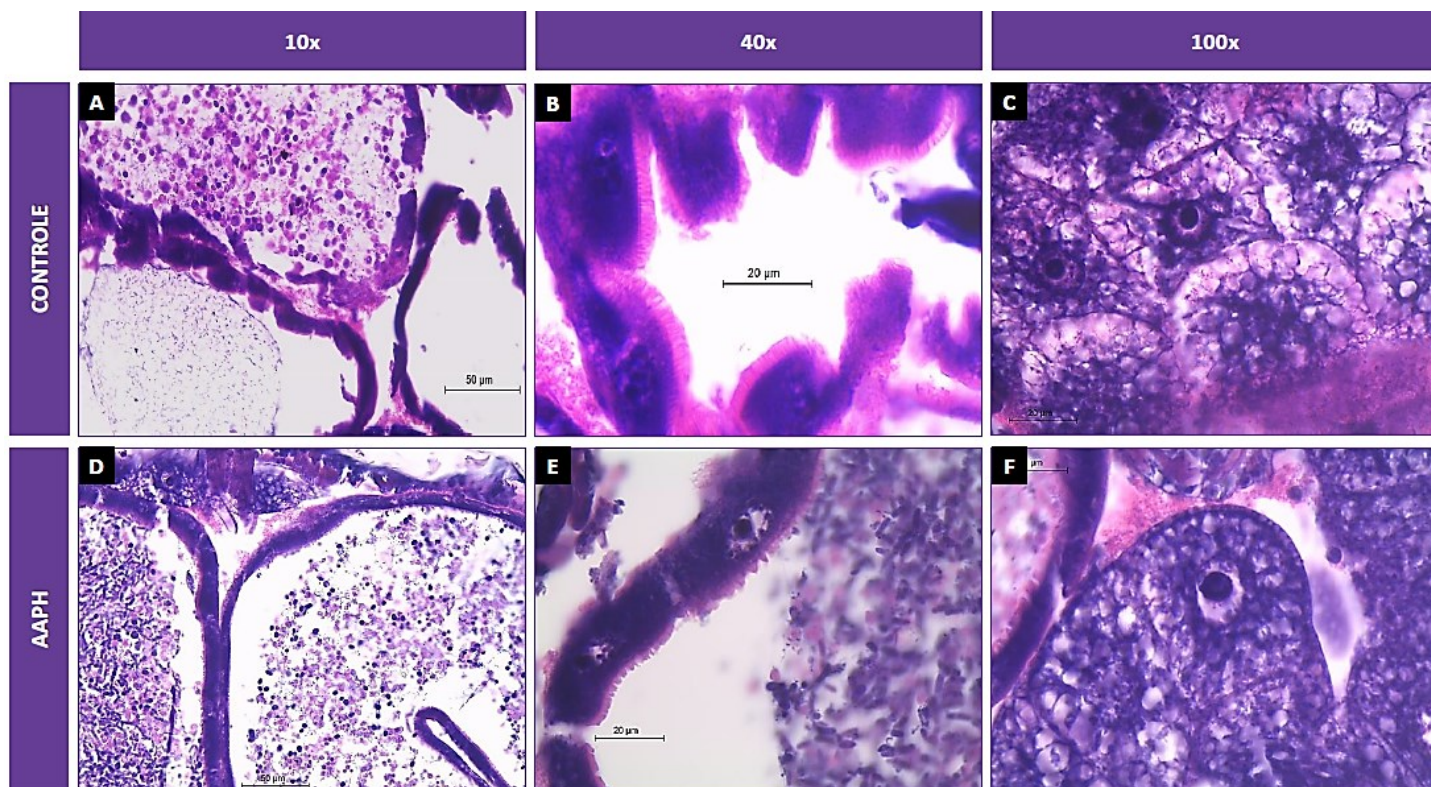
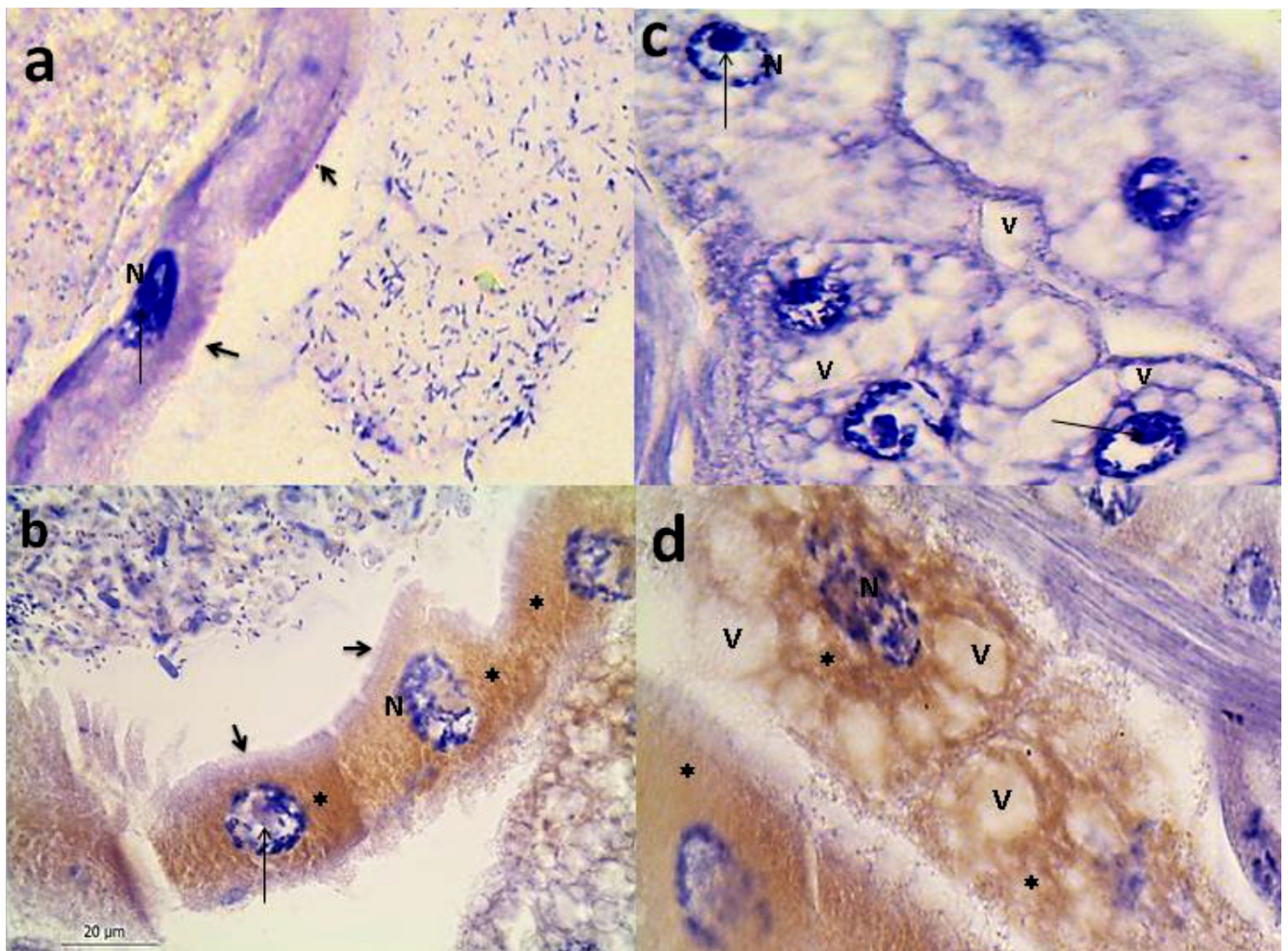


Figura 10. Cortes histológicos da região do trato gastrointestinal de larvas de *Drosophila melanogaster*, grupos controle e exposta ao 2,2'-azobis-2-amidinopropane. Coloração H&E. Em (A)-(B)-(C) vemos cortes referentes ao trato digestivo e células de gorduras do grupo controle. E em (D)-(E)-(F) cortes referentes ao trato digestivo e células do corpo gorduroso das larvas expostas ao AAPH. Fotografadas a 10x, 40x, e 100x respectivamente.

5.6 Imunohistoquímica para Caspase-3 Clivada

As células DAB positivas (marrons) representam células positivas para caspase-3 e as células positivas para hematoxilina (azuis) representam outras células sem a presença da caspase-3 clivada. Em **(a)** são vistos células do trato gastrointestinal do grupo controle, sem imunomarcção para caspase-3 clivada, com coloração por hematoxilina **(b)** células do trato gastrointestinal de larvas expostas ao AAPH, sendo mostrado forte imunomarcção com células DAB positivas, além disso, apresentam distribuição irregular de material genético no núcleo. Em **(c)** células do corpo de gordura perivisceral do grupo controle apresentando coloração hematoxilina positiva, nucléolo evidente com distribuição de material genético periférico. **(d)** Células corpo de gordura perivisceral de larvas expostas ao AAPH, apresentando material nuclear fragmentado sem visualização de nucléolo e forte imunomarcção para caspase-3 clivada **(e)** Quantificação da frequência de células DAB positivas.



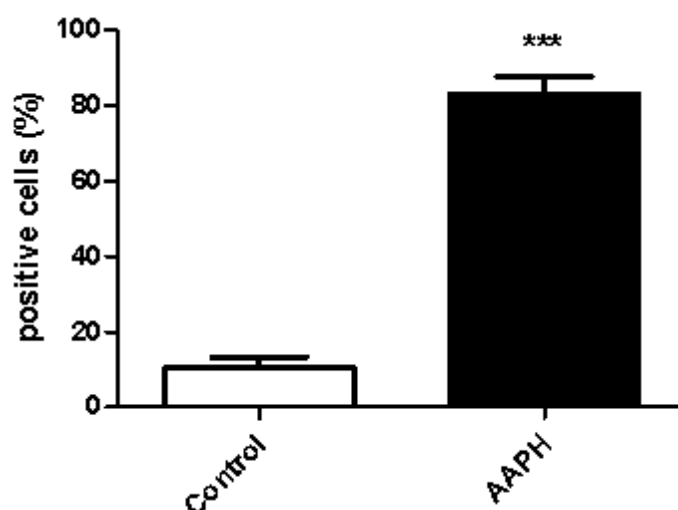


Figura 11. Coloração Imuno-histoquímica de Caspase-3 Clivada de Células do Trato Gastrointestinal e Corpo de Gordura Perivisceral de Larvas Expostas ao 2,2'-azobis-2-amidinopropane. As células DAB + (marrons) representam marcação positiva para caspase-3 e as células positivas para hematoxilina (azuis) representam outras células sem a presença da caspase-3 clivada. (a) Células de controle do trato gastrointestinal (b) Células do trato gastrointestinal de larvas expostas a AAPH (c) Células do corpo de gordura perivisceral do controle e em (d) Células do corpo de gordura perivisceral de larvas expostas a AAPH. (e) Quantificação da frequência de células DAB positivas. Setas pequenas indicam borda em escova, N representa o núcleo da célula, setas grandes e finas mostram o nucléolo e V os vacúolos citoplasmáticos.

Parte 2

Efeitos da exposição à nanopartículas de pontos quânticos de seleneto de cádmio no estresse oxidativo e apoptose celular em larvas de *Drosophila melanogaster*

5.7 Caracterização do QD CdSe

5.7.1 Infravermelho com Transformada de Fourier

Na figura 12, é possível visualizar os principais picos da análise estrutural realizada no FTIR. O pico largo em 3350 cm^{-1} representa grupos hidroxila na estrutura. Bandas em torno de 2929 cm^{-1} correspondem a interações C-H, como CH_2 e CH_3 em hidrocarbonetos alifáticos. Uma banda em 1090 cm^{-1} corresponde a vibrações C-N possivelmente de amins alifáticas. Perto de 1590 e 1400 cm^{-1} existem sinais indicando vibrações de C = O e N-H de amins e amidas. Finalmente, picos em 1590 , 1400 e 970 cm^{-1} também podem indicar a presença de ligações duplas C = C, seja de um anel ou de uma cadeia alifática.

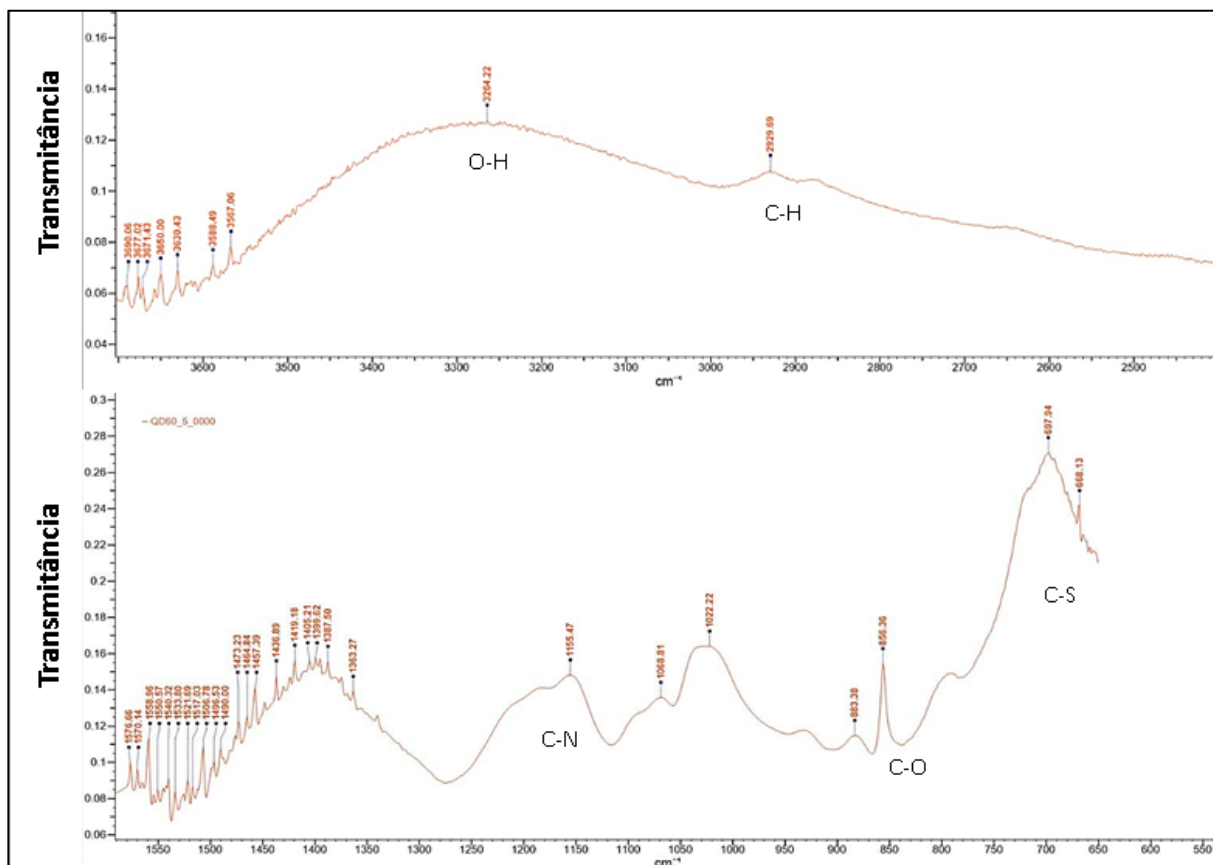
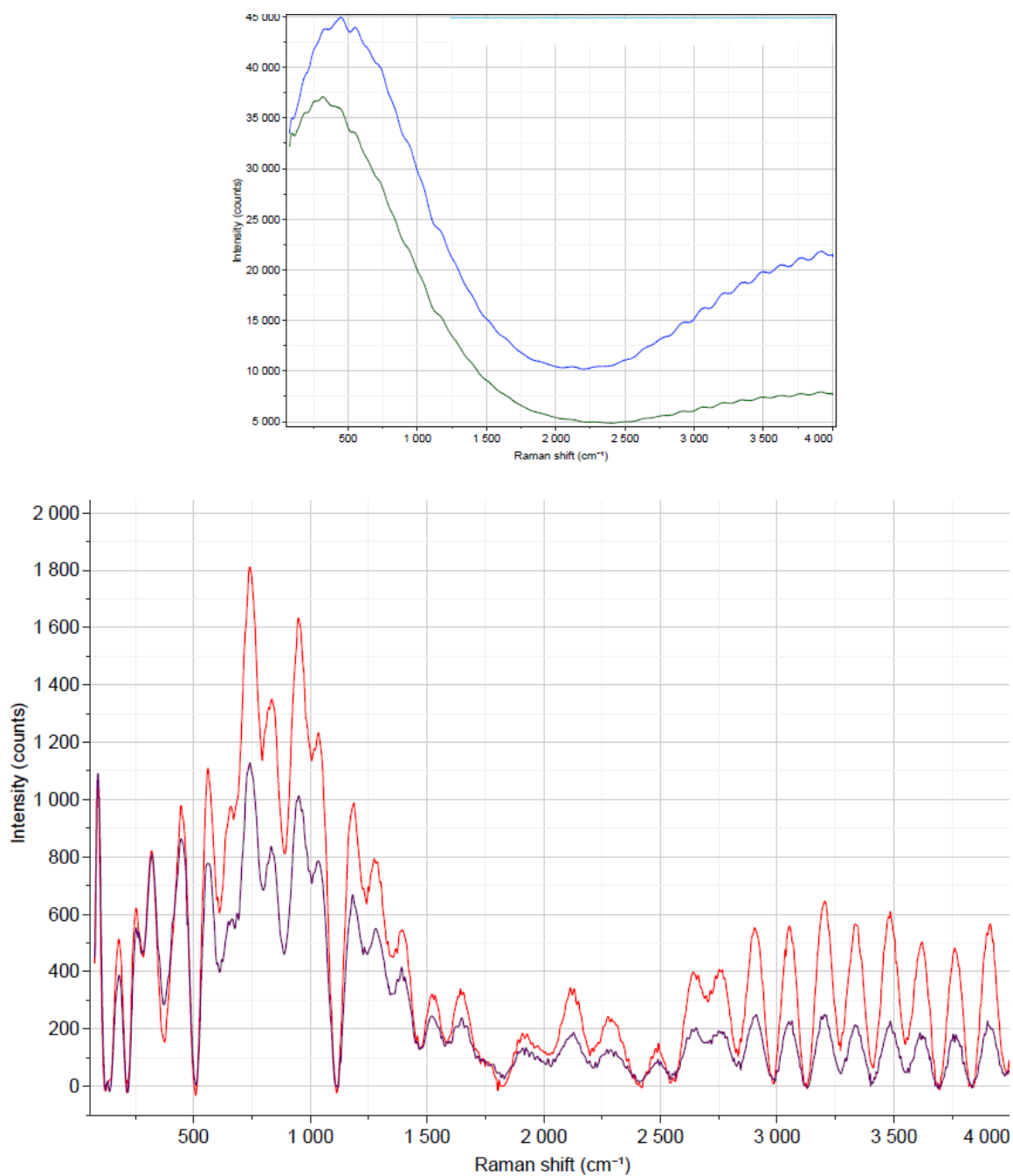


Figura 12. Espectros de Infravermelho com Transformada de Fourier da nanopartícula de quantum dot de CdSe na faixa de 3500 cm^{-1} a 500 cm^{-1} .

5.7.2 Espectroscopia Raman



Date		Acq. time (s)		Accumulations		Laser (nm)	
Spectro (cm ⁻¹)		Hole		Slit		Grating	
ND Filter		Objective		ICS correction		Range (cm ⁻¹)	

Powered by
LabSpec 6 from:

HORIBA
Scientific

Figura 13. Espectros de FT-Raman do filme de nanopós dispersos de quantum dot de CdSe.

5.7.3 Espectroscopia de Absorvância, Fluorescência e Microscopia Óptica

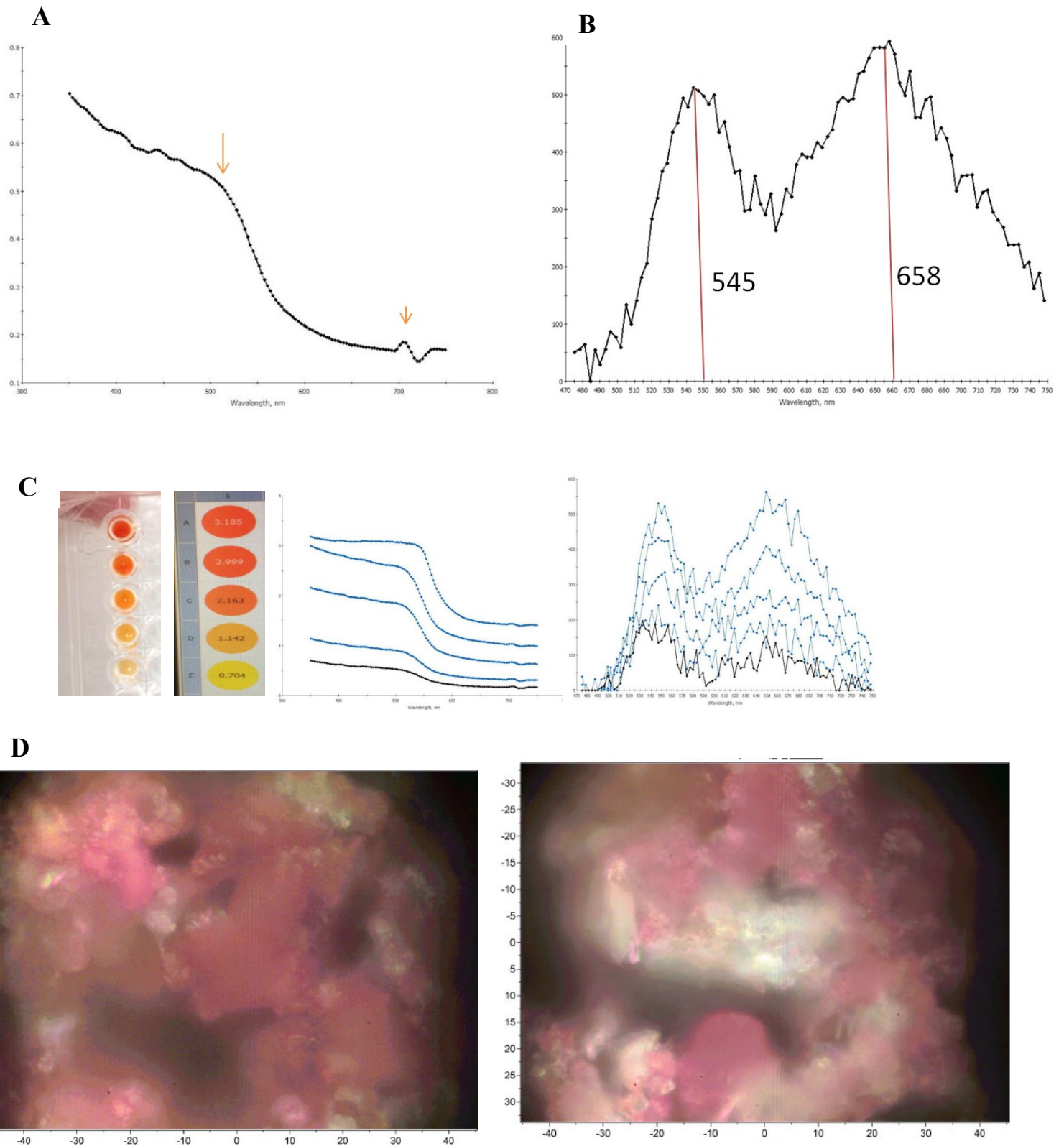


Figura 14. Em A, absorvância e B fluorescência realizadas em espectrofluorímetro em largo espectro de emissão. Em C, mesmas medidas em 5 concentrações graduais. E D, imagens de microscopia óptica de nanopós dispersos e secos.

5.8 Toxicidade no desenvolvimento embrio-larval

A Figura 15-A é mostrado que a exposição ao *quantum dot* de CdSe nas concentrações 0,1mg/mL e 0,3mg/mL não são capazes de alterar de forma significativa a porcentagem na geração de pupas a partir dos ovos pré-adicionados. Mas a exposição à concentração de 0,3 mg/mL foi capaz de reduzir de forma signicativa a porcentagem de emergencia de novos individuos adultos, como é visto em 15-B, demonstrando que o QD CdSe na concentração de 0,3 mg/mL é capaz de provocar toxicidade, reduzindo a geração de moscas adultos a partir dos ovos expostos.

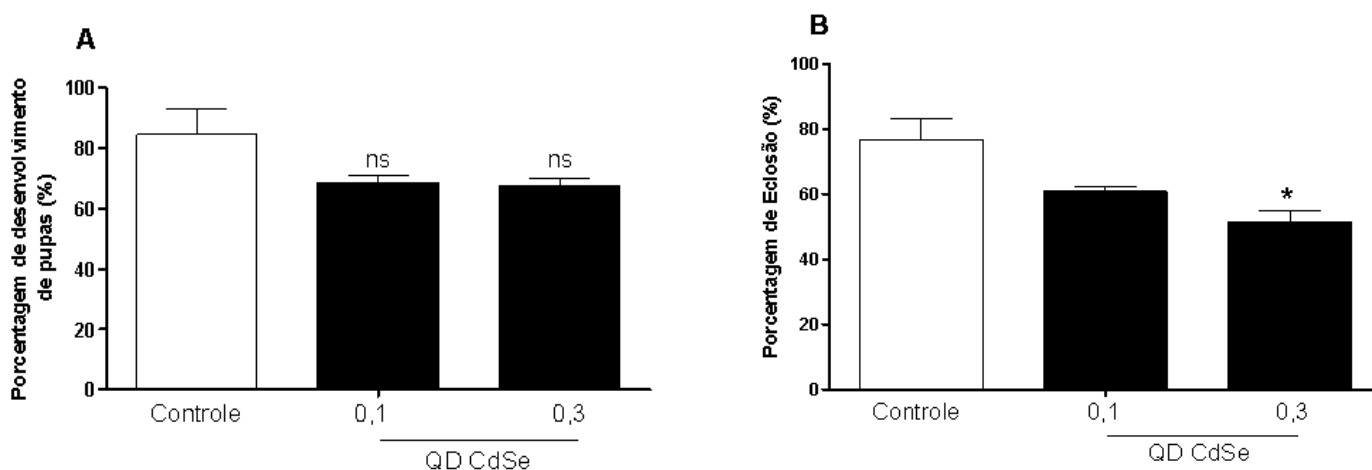


Figura 15. Efeitos da exposição ao quantum dot de seleneto de cádmio durante o desenvolvimento de *Drosophila*: ensaio de geração de pupas e emergência de moscas adultas. Larvas foram expostas à concentração de 0,1 mg/mL e 0,3 mg/mL de *quantum dot* CdSe. A) Taxa de desenvolvimento de ovos a pupas. B) Taxa de emergência de moscas. (Média $\pm$ DP, $n = 3$, 50 ovos por amostra). Teste: One Way ANOVA, pos test bonferroni. Valores expressos como média $\pm$ erro padrão, * $p < 0,05$ versus grupo controle, ns não significativo.

5.9 Análise de marcadores de danos oxidativo

5.9.1 Peroxidação lipídica

A Figura 16 mostra que a exposição de QD CdSe 0,1 mg/mL foi capaz de aumentar significativamente os danos lipídicos na larva em L3. Foram encontrados maiores níveis de malondialdeído (MDA), um produto final da peroxidação lipídica provocada por danos teciduais. As figuras a seguir utilizaram o grupo controle como comparativo, definido como grupo usado para comparação que recebeu apenas água destilada. Enquanto que os níveis de MDA das larvas expostas a 0,3 mg/mL foi bem próximo ao controle.

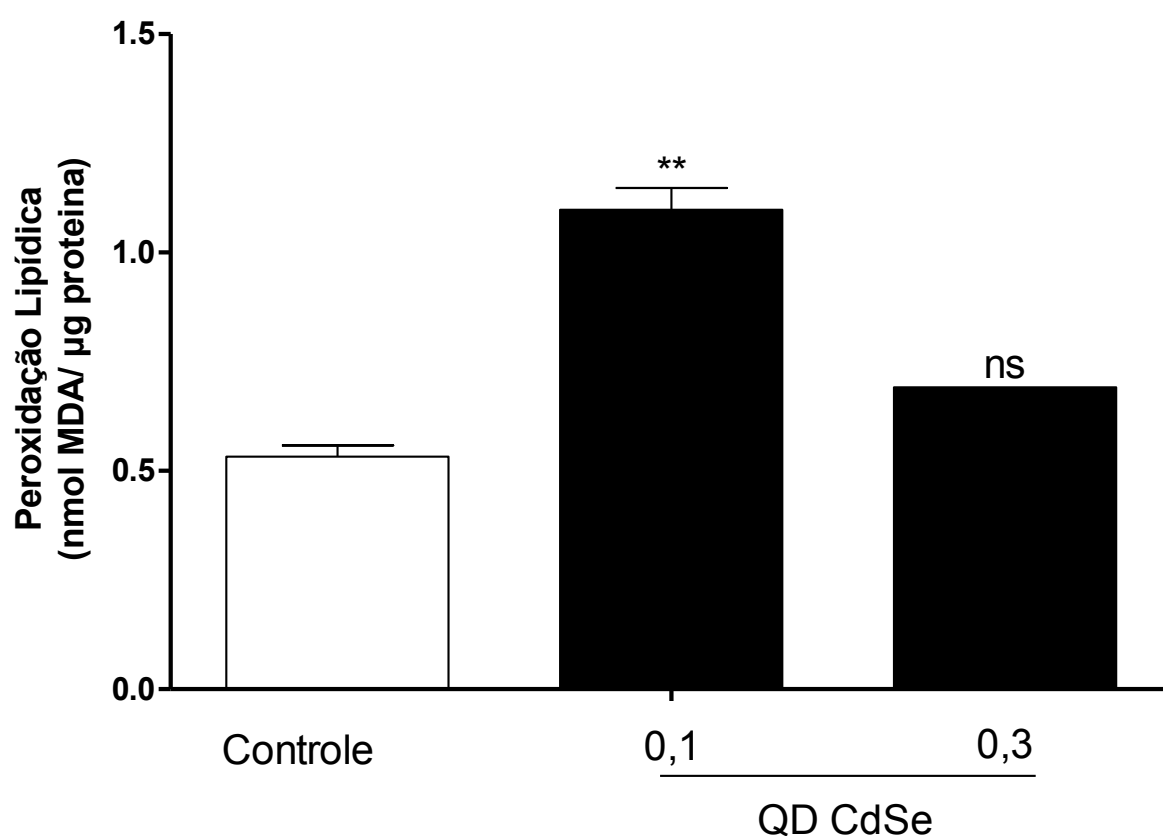


Figura 16. Níveis de Malondialdeído em larvas expostas ao quantum dot de seleneto de cádmio. Larvas de *Drosophila* foram expostas à concentração de 0,1 mg/mL e 0,3 mg/mL de *quantum dot* CdSe. (Média ± DP, n = 3, 50 ovos por amostra). Teste: One Way ANOVA, pos test bonferroni. Valores expressos como média ± erro padrão **p<0,01 versus grupo controle, ns não significativo.

5.9.2 Produtos Proteicos de Oxidação Avançadas

Em relação aos níveis de Produtos Proteicos de Oxidação Avançadas, os tratamentos foram semelhantes estatisticamente, não sendo encontradas diferenças significativas sobre danos proteicos na larva em L3.

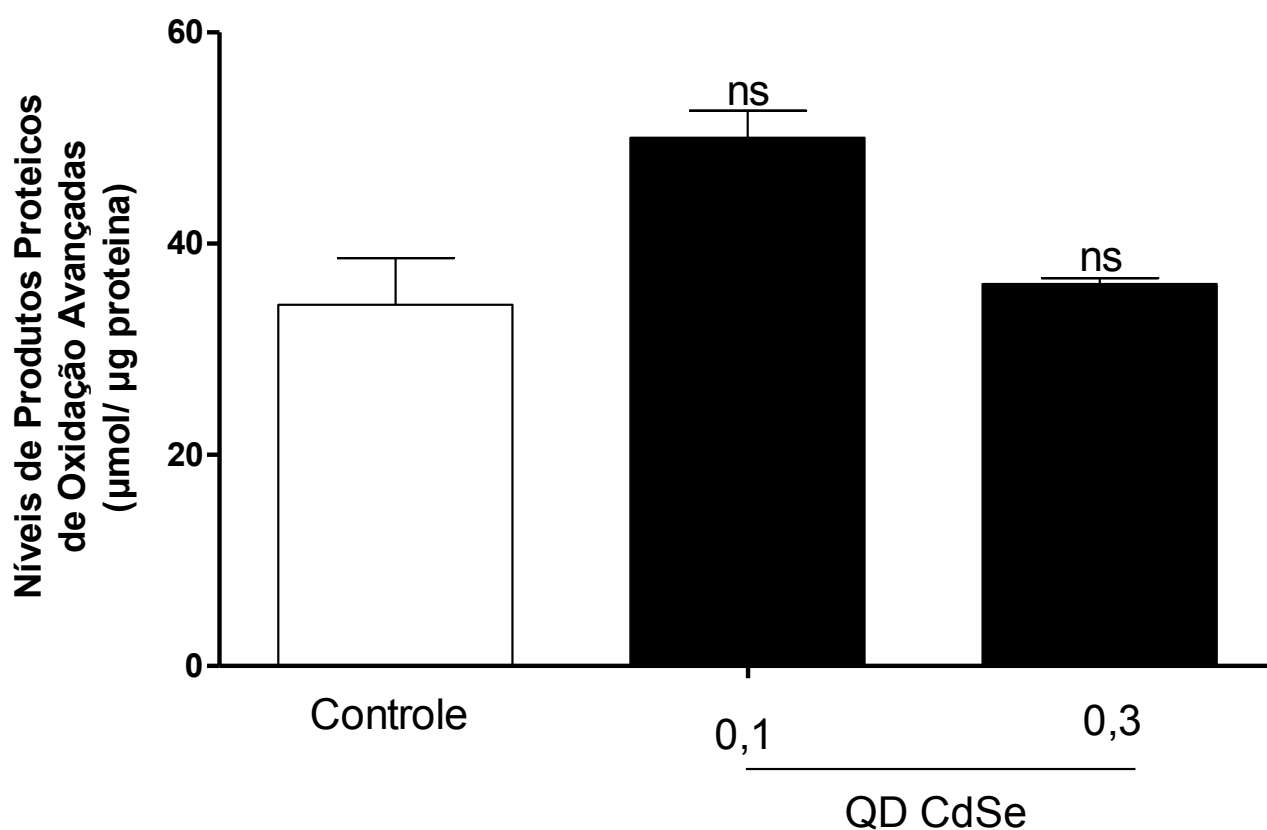


Figura 17. Níveis de AOPP em larvas de *Drosophila* expostas à concentração de 0,1 mg/mL e 0,3 mg/mL de *quantum dot* CdSe. (Média $\pm$ DP, n = 3, 50 ovos por amostra). Teste: One Way ANOVA, pos test bonferroni. Valores expressos como média $\pm$ erro padrão versus grupo controle, ns não significativo.

5.10 Avaliação de marcadores antioxidantes

5.10.1 Atividade da Superóxido Dismutase

A atividade da SOD larval foi influenciada pela exposição ao QD CdSe, se mostrando aumentada na concentração de 0,3 mg/mL de forma significativa quando comparada com o controle, como é visto na Figura 18. A exposição na concentração de 0,1 mg/mL não afetou a atividade da SOD, sendo semelhante ao controle.

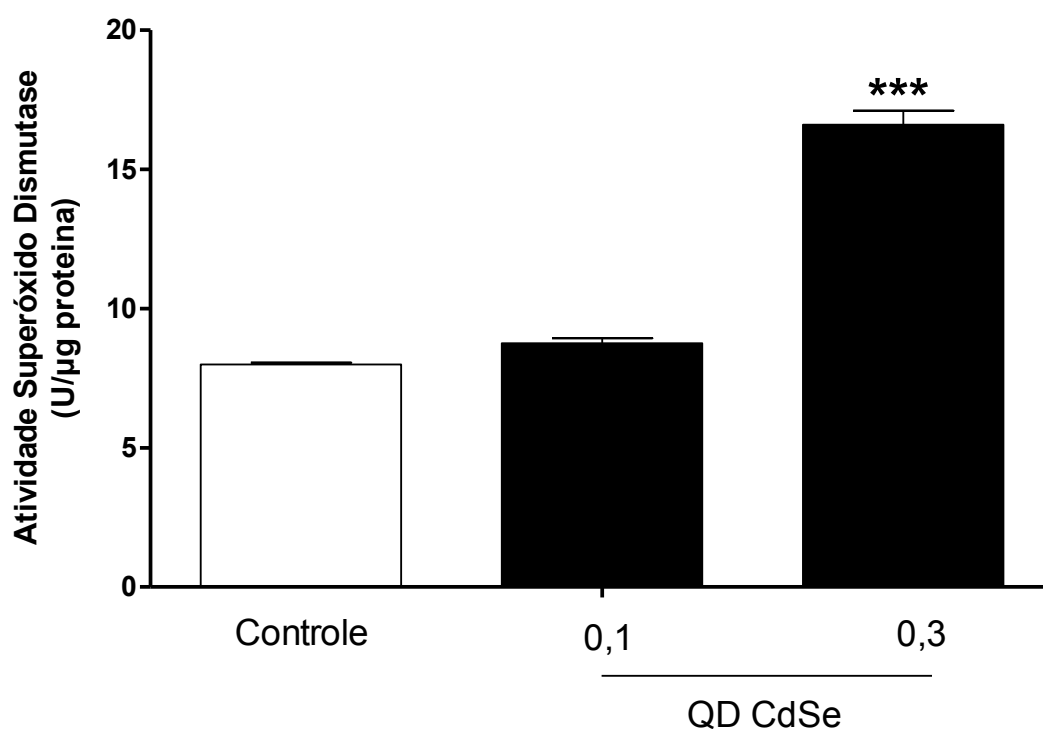


Figura 18. Atividade da superóxido dismutase de larvas de *Drosophila melanogaster* expostas ao quantum dot de seleneto de cádmio no período desenvolvimental. Atividade da Enzima Superóxido Dismutase em larvas de *Drosophila* expostas à concentração de 0,1 mg/mL e 0,3 mg/mL de QD CdSe. (Média $\pm$ DP, n = 3, 50 ovos por amostra). Teste: One Way ANOVA e post hoc bonferroni. Valores expressos como média $\pm$ erro padrão ***p<0,001 versus grupo controle.

5.10.2 Atividade Catalase

Na Figura 19 é mostrado a atividade da CAT larval, que se mostrou reduzida na concentração de 0,1 mg/mL de forma significativa quando comparada com o controle. A exposição na concentração de 0,3 mg/mL não afetou a atividade da CAT, sendo semelhante ao controle.

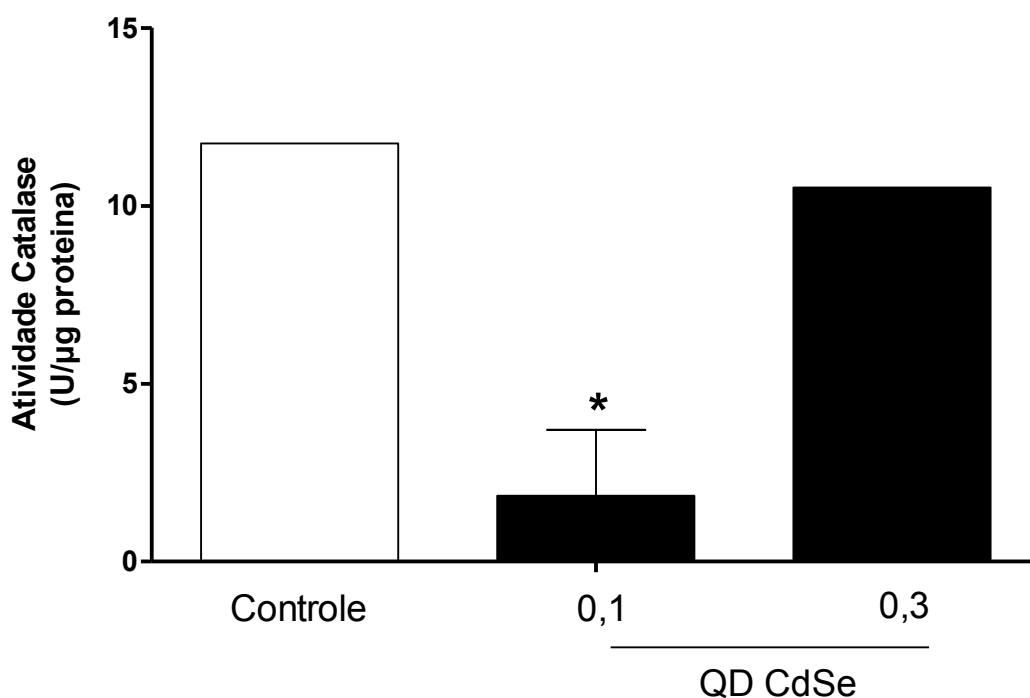


Figura 19. Atividade da Catalase de larvas de *Drosophila melanogaster* expostas ao quantum dot de seleneto de cádmio no período desenvolvimental. Atividade da Enzima Catalase em larvas de *Drosophila* expostas à concentração de 0,1 mg/mL e 0,3 mg/mL de QD CdSe. (Média ± DP, n = 3, 50 ovos por amostra). Teste: One Way ANOVA e post hoc bonferroni. Valores expressos como média ± erro padrão *p<0,05 versus grupo controle.

5.10.3 Capacidade antioxidante total (FRAP)

A capacidade antioxidante total se mostrou significativamente aumentada nas larvas expostas ao QD CdSe 0,3 mg/mL, quando comparadas com controle e a concentração de 0,1 mg/mL. E semelhante o que foi visto na SOD, a concentração de 0,1 mg/mL e o controle foram proximos, não havendo desbalanço nesses parametros redox.

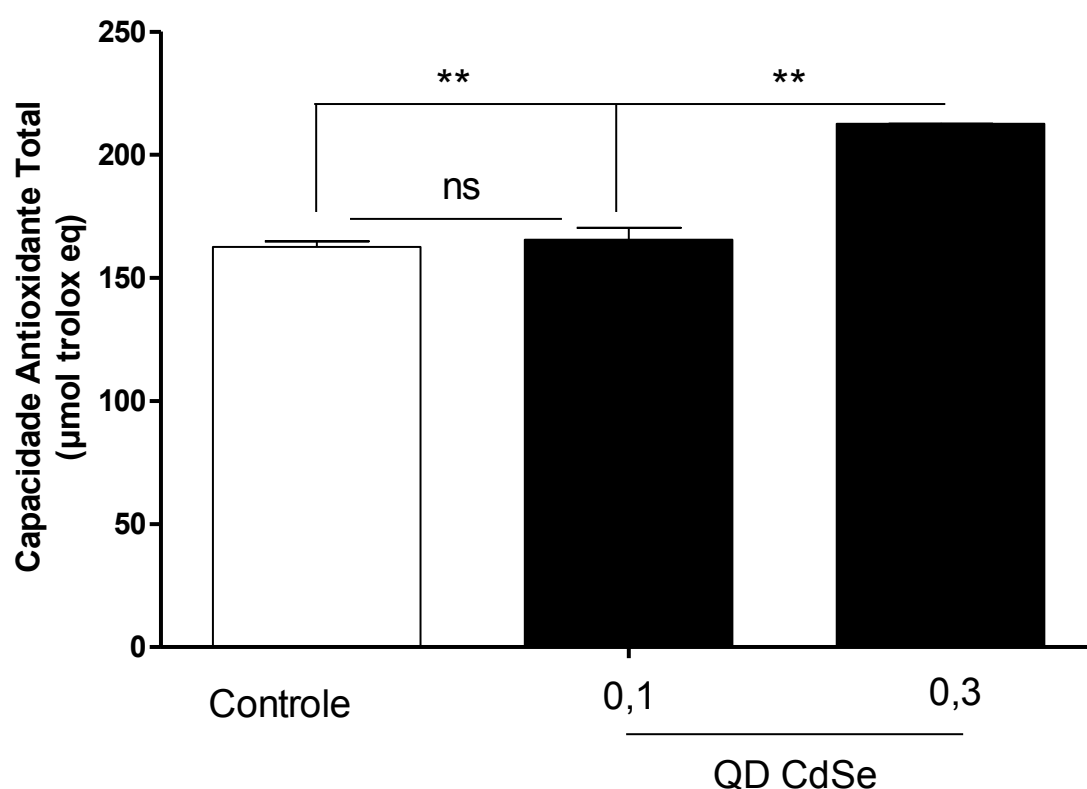


Figura 20. Capacidade Antioxidante Total de larvas de *Drosophila melanogaster* expostas ao quantum dot de seleneto de cádmio no periodo desenvolvimental. Capacidade Antioxidante Total em larvas expostas à concentração de 0,1 mg/mL e 0,3mg/mL de QD CdSe. (Média $\pm$ DP, n = 3, 50 ovos por amostra). Teste: One Way ANOVA e post hoc bonferroni. Valores expressos como média $\pm$ erro padrão **p<0,01 versus grupo controle, ns não significativo.

5.10.4 Conteúdo Intracelular de ROS (DCFH-DA)

Foi usado a sonda DCFH-DA para medir os níveis de geração de ROS total nas larvas em L3 expostas ao QD CdSe, e é mostrado na Figura 21. As larvas do grupo QD CdSe 0,3 mg/mL apresentaram uma menor geração de ROS ($96,35 \pm 0,10$ IF DCF) de forma significativa quando comparada com o grupo controle ($313,68 \pm 20,18$ IF DCF). Na concentração de 0,1 mg/mL não houve diferença significativa no conteúdo intracelular de ROS ($241,21 \pm 32,95$ IF DCF).

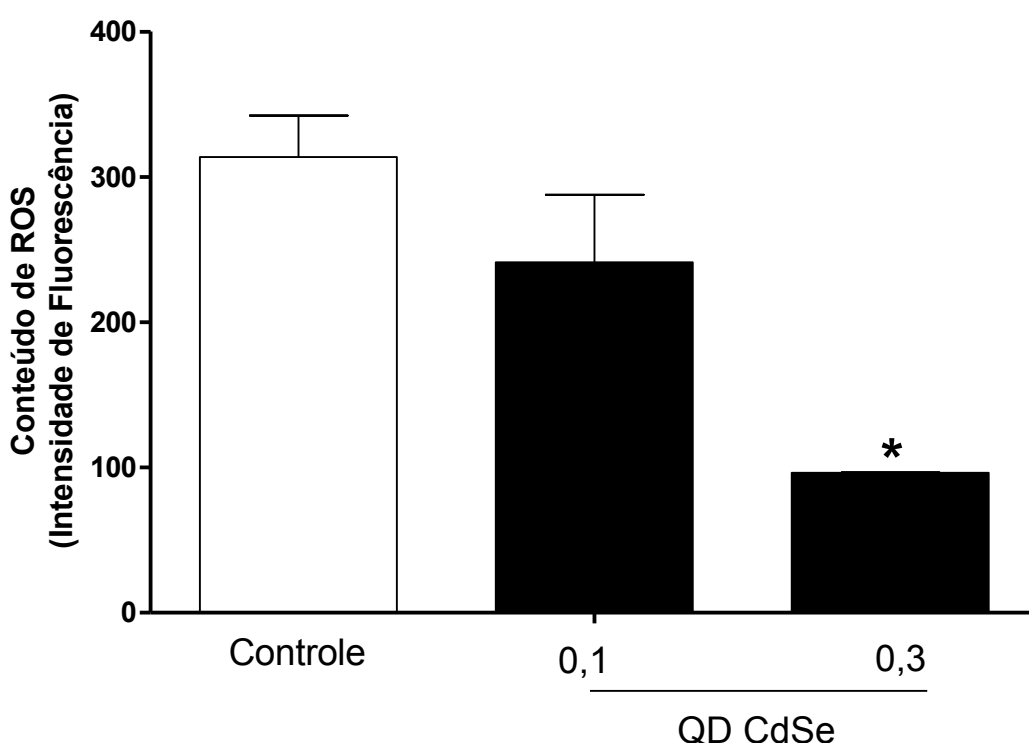


Figura 21. Conteúdo Intracelular de ROS de larvas de *Drosophila melanogaster* expostas ao quantum dot de seleneto de cádmio no período desenvolvimental. Conteúdo Intracelular de ROS em larvas de *Drosophila* expostas à concentração de 0,1 mg/mL e 0,3 mg/mL de QD CdSe. (Média $\pm$ DP, $n = 3$, 50 ovos por amostra). Teste: One Way ANOVA e post hoc bonferroni. Valores expressos como média $\pm$ erro padrão * $p < 0,05$ versus grupo controle.

5.11 Ensaio Smurf: Permeabilização Intestinal

Na figura 22, é possível visualizar os fenótipos Smurfs, caracterizado por um aumento dramático da permeabilidade intestinal que pode ser observado *in vivo* usando um ensaio não invasivo com microscopia. Na Fig. 22A, temos uma larva do grupo controle que teve seu desenvolvimento na presença do meio tradicional sem corante apresentando uma coloração normal. Em B, foi adicionado o corante (FD&C azul #1) no meio tradicional e é possível visualizar a marcação da porção final do intestino da larva em L3, e sem extravasamentos. A imagem representada na Fig. 6C, o QD CdSe 0,1 mg/mL e o corante e notasse que há um leve extravasamento do corante nas proximidades do intestino. Na presença de QD CdSe 0,3 mg/mL (Fig. 6D) é possível um aumento drástico do extravasamento do corante azul para outros tecidos, tendo sido marcando toda a porção inferior, denotando um aumento na permeabilidade intestinal derivado da co-ingestão do QD. Esses resultados indicaram que as células do intestino médio das larvas de *Drosophila* apresentaram dano celular sob a exposição ao QD CdSe, e o grau de dano aumentou de forma dose-dependente.

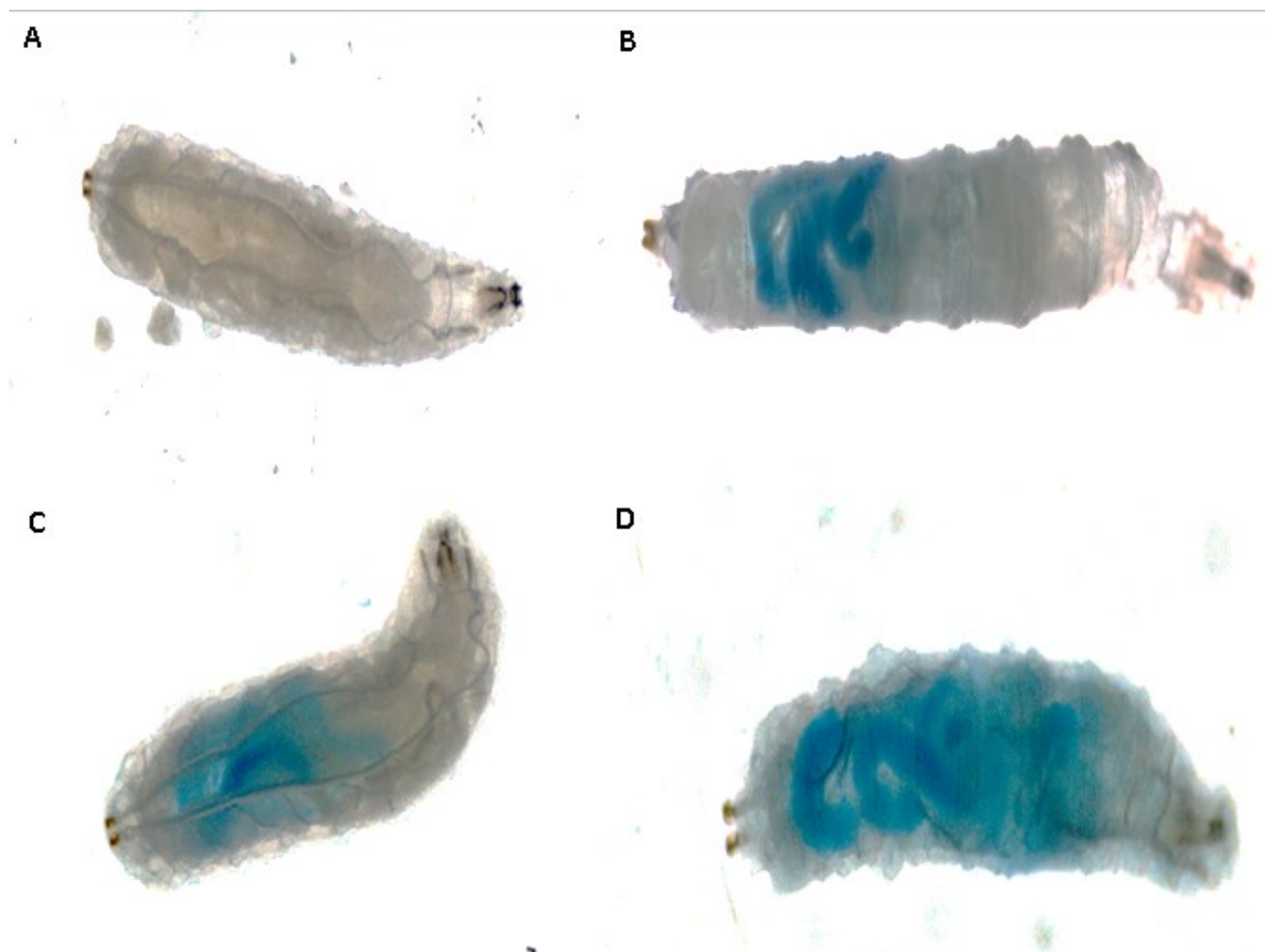


Figura 22. Faixa de fenótipos exibidos pelas larvas expostas ao QD CdSe utilizando um corante alimentar azul não absorvente (FD&C azul #1). Faixa de fenótipos exibidos pelas larvas L3 após a ingestão dos meios. (a) Controle sem corante alimentar azul. (b) Controle com corante alimentício azul. (c) Tratamento de QD CdSe 0,1 mg/mL + FD&C azul #1. (d) Tratamento de QD CdSe 0,3 mg/mL + FD&C azul #1..

5.12 Imuno-histoquímica para Caspase-3 clivada

A imunohistoquímica para caspase-3 clivada do intestino médio de larvas expostas ao QD CdSe foi mostrado na figura 7. Esse resultados mostram que houve um aumento de CC3 significativo no intestino de larvas expostas a concentração de QD CdSe 0,3 mg/mL, denotando forte presença de morte celular. Em A e B, são mostrados regiões do intestino da larva controle coradas pela hematoxilina, é possível visualizar enterócitos com borda em escova bem definidas sem marcação DAB +, e a presença de um grupo de trofócitos. Nas imagens C e D, vemos que a exposição ao QD CdSe 0,1 mg/mL não provocou danos celulares, a marcação de hematoxilina sem DAB positivo, é possível visualizar a luz do intestino preenchida por conteúdo alimentar e enterócitos retangulares com borda escova ligeiramente acidófila. Com o aumento da concentração para 0,3 mg/mL, houve a presença de CC3 nas células do intestino da larva. Como mostrado em E e F, a presença de toda uma extensão de enterócitos marcados positivamente com presença de um pouco de conteúdo alimentar, núcleos fortemente basofílicos. A mucosa intestinal e seus tecidos e glândulas auxiliares constituem uma barreira complexa e eficaz a possíveis danos causados por xenobióticos, e sabe-se que a histologia intestinal está intimamente ligada à função intestinal (MOTTA et al., 2022).

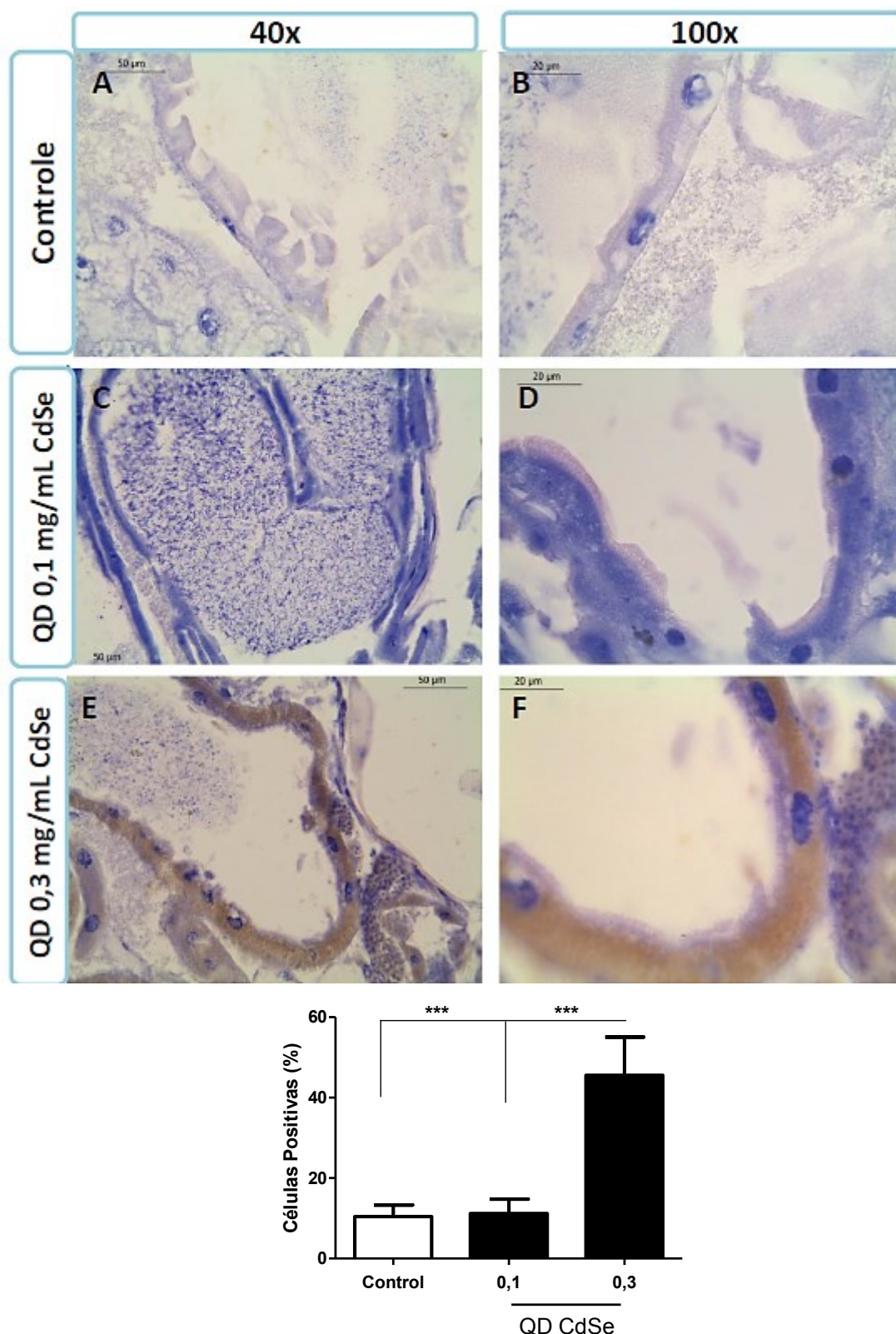


Figura 23. Coloração Imuno-histoquímica de Caspase-3 Clivada em células do trato gastrointestinal de larvas em 3^o ínstar expostas ao QD CdSe. As células DAB + (marrons) representam marcação positiva para caspase-3 e as células positivas para hematoxilina (azuis) representam outras células sem a presença da caspase-3 clivada. (A) e (B) Células do trato gastrointestinal de larvas controle, (C) e (D) Células do trato gastrointestinal de larvas expostas a QD 0,1 mg/mL de CdSe, (E) e (F) Células do trato gastrointestinal de larvas expostas a QD 0,3 mg/mL de CdSe, (G) Frequência da presença de células DAB positivas.

Drosophila tem um sistema circulatório aberto, de modo que os nutrientes que atravessam o epitélio intestinal entram na hemolinfa e são transferidos aos corpos de gordura favorecendo a absorção de nutrientes, desempenhado forte papel no funcionamento e sobrevivência das larvas (MORAES e MONTAGNE, 2021). Na figura 8, é mostrado trofócitos corados por hematoxilina, grupo de células pertencentes aos corpos de gordura, caracterizados pela presença dos vacuolos lipídicos. Em A, temos células do grupo controle com grandes vacuolos lipídicos, nucléolo bem evidente e a presença de uma condensação perinuclear com vacuolos nucleares. Em B, células do grupo exposto a QD 0,1 mg/mL CdSe mostrando também grande número de vacuolos lipídicos e núcleos bem condensados com nucléolo evidente. Em C, células do grupo exposta a QD 0,3 mg/mL CdSe denotando marcação para DAB positiva, e núcleos bem condensados com material genético distribuído sem demarcação do nucléolo.

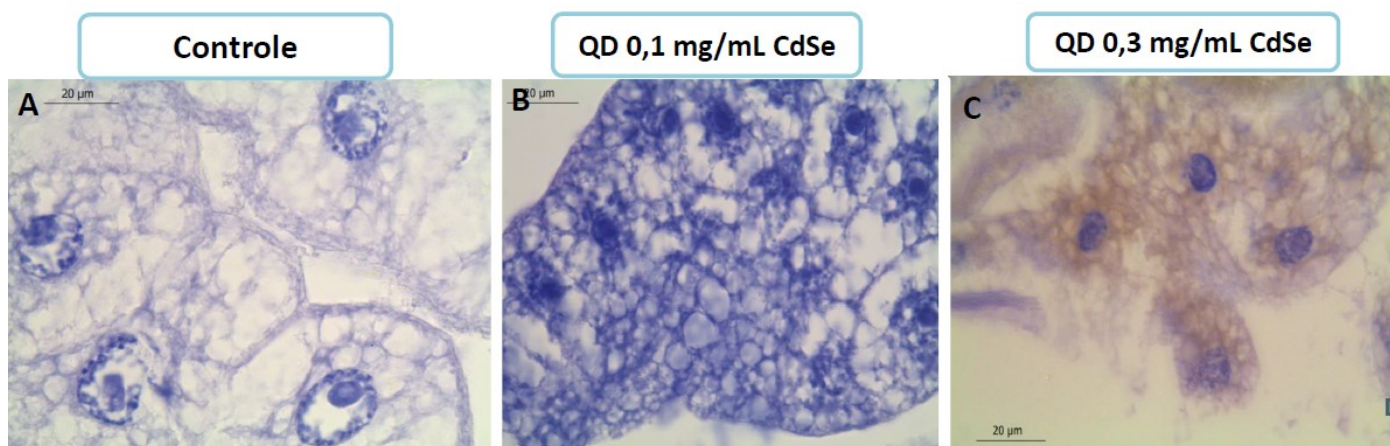


Figura 24. Coloração Imuno-histoquímica de Caspase-3 Clivada em Trofócitos Larvais de *Drosophila Melanogaster*. (A) Células de larvas controle, (B) Células de larvas expostas a QD 0,1 mg/mL de CdSe, (C) Células de larvas expostas a QD 0,3 mg/mL de CdSe. As células DAB + (marroms) representam marcação positiva para caspase-3 e as células positivas para hematoxilina (azuis) representam outras células sem a presença da caspase-3 clivada. Aumento de 100X, microscopio óptico.

6. Discussão

O presente estudo teve como foco verificar os efeitos da exposição ao quantum dot de CdSe e a toxicidade de AAPH usando o modelo de larvas de *Drosophila*. Para isso foi utilizado o AAPH para gerar radicais livres para estudar os efeitos do estresse oxidativo no organismo vivo em desenvolvimento de *Drosophila melanogaster*. Essa pequena molécula é um gerador de radical peroxila solúvel em água e iniciador da peroxidação lipídica (YANAMOTO et al., 1985), mantendo uma taxa constante de produção de radicais livres no ambiente desenvolvimental que pode induzir danos oxidativos. Um bom equilíbrio entre a produção de ROS e a desintoxicação é essencial para manter as funções celulares normais (KARBOWNIK e LEWINSKI, 2003) e envolve mecanismos complexos de identificação e reparo.

O sistema de defesa antioxidante tem a função de inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação dos radicais livres, através de diferentes mecanismos como: prevenir a formação de radicais livres, quando formados, impedindo sua ação ou, ainda, favorecendo a reparação e a reconstituição de estruturas danificadas (MARTEMUCCI et al., 2022). Existem vários métodos que podem ser usados para determinar o nível de oxidação dentro de tecidos e células. A exposição ao AAPH no período desenvolvimental foi capaz de gerar um desbalanço no sistema redox da larva, e também foram encontrados danos oxidativos. A SOD representa um dos componentes enzimáticos do sistema de defesa antioxidativo, integrando um grupo de metaloenzimas que catalisam a conversão de $O_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 , em diferentes compartimentos celulares (SALVADOR e HENRIQUES, 2004), por meio de uma reação de dismutação.

As larvas expostas apresentaram uma alta atividade da SOD, na tentativa de neutralizar o ânion $-O_2^{\bullet}$ como resposta antioxidante. A dismutação do ânion superóxido leva a formação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), como visto as larvas expostas apresentaram uma alta atividade da SOD e consequentemente uma atividade da catalase aumentada, cuja principal função é catalisar a conversão do peróxido de hidrogênio em oxigênio e água. Apesar de não ser um radical livre, por não ter um elétron desemparelhado na sua última camada eletrônica, é uma espécie com alto potencial reativo. Por participar da reação de geração de OH tem ação deletéria potencial, uma vez que esse se constitui no mais reativo dos radicais livres, pois pode alterar qualquer estrutura celular que se encontre próxima. Diferente dos radicais livres, o H_2O_2 tem vida longa e é capaz de atravessar as membranas celulares apresentando-se potencialmente tóxico para as células (LIMÓN-PACHECO e GONSEBATT, 2009).

O sistema de defesa enzimático composto pela Superóxido Dismutase (SOD) e Catalase (CAT) agem por meio de mecanismos de prevenção, impedindo e/ou controlando a formação de radicais livres e espécies não-radicais, envolvidos com a iniciação das reações em cadeia que culminam com propagação e amplificação do processo e, conseqüentemente, com a ocorrência de danos oxidativos, agindo com o mesmo propósito, ou seja, o de impedir o acúmulo de peróxido de hidrogênio. Tal ação integrada é de grande importância, uma vez que essa espécie reativa, por meio das reações de Fenton e Haber-Weiss, mediante a participação dos metais ferro e cobre, culmina na geração do radical OH, contra o qual não há sistema enzimático de defesa (DEMIRCI-ÇEKİÇ et al., 2022).

A peroxidação de ácidos graxos insaturados presente nas membranas lipídicas é um processo conhecido como peroxidação lipídica. Este processo gera graves alterações da membrana celular, causando perda da fluidez, alteração da função secretora e dos gradientes iônicos transmembrana. Dentre os peróxidos de lipídeos formados, que reagem com o ácidotiobarbitúrico (TBA), destaca-se o malondealdeído, embora outros compostos como açúcar, aminoácidos e bilirrubina podem reagir também com o TBA (MEAGHER & FITZGERALD, 2000). Dentre os produtos derivados da peroxidação lipídica decorrente do ataque dos radicais livres aos lipídeos de membrana esta o MDA. O MDA quando aquecida na presença do TBA forma um composto de coloração rosada, a qual é lida espectrofotometricamente (YAGI, 1982). Durante o teste TBARS, uma molécula de MDA reage com duas moléculas de ácido tiobarbitúrico em pH baixo e altas temperaturas para formar o complexo "TBA-MDA" de cor rosa (YAGI, 1982). No presente trabalho os níveis de TBARS nas larvas expostas ao AAPH foram cerca de 4 vezes maiores quando comparada com o grupo controle, demonstrando a extensão do dano que é o desenvolvimento na presença de altos níveis de ROS. Níveis aumentados de MDA têm sido relacionados com perda da seletividade na troca iônica, com liberação do conteúdo de organelas, levando à formação de produtos citotóxicos e morte celular.

Além de danos lipídicos, os nossos resultados revelaram o aumento significativo de danos oxidativos proteicos nas larvas expostas ao AAPH, o processo de oxidação de proteínas é especialmente prejudicial, pois as alterações conformacionais induzidas nas estruturas das proteínas podem tornar as proteínas oxidadas inativas e levando a anormalidades funcionais celulares (BARAIBAR et al., 2012). Podem ocorrer diversos tipos de modificações oxidativas de proteínas induzidas diretamente por ROS ou indiretamente, através de reações com subprodutos do estresse oxidativo. Através da Oxi-proteoma sabe-se que há um grupo restrito de proteínas que são alvos da oxidação,

sendo a principal fonte para efeitos deletérios nas células, órgãos e consequentemente sua função (STADTMAN e LEVINE., 2003).

Nesse modelo, as larvas recém-eclodidas foram expostas durante todo o seu processo de desenvolvimento larval ao AAPH, e então em L3 foram medidos a quantidade de ROS intracelular, sendo mostrado que foi significativamente menor ao encontrado nas larvas controle. Em concomitância, foi encontrada uma alta capacidade antioxidante para esse mesmo grupo. Porém mesmo com sua alta atividade o dano lipídico e proteico não foi revertido, pois a produção de radicais livres produzidos neste modelo supera a capacidade de ação do sistema antioxidante.

O AAPH em meio aquoso gera constantemente moléculas que causam danos, possuindo uma meia-vida de cerca de 175h a 37°C em pH neutro (LANDI et al., 1995; PELUSO et al., 2002), permitindo que a taxa de geração de radicais livres seja essencialmente constante durante toda a fase desenvolvimental até a larva em 3 ínstar. Pode-se inferir que os danos causados pelo AAPH no primeiro estágio gere uma reação de danos oxidativos que danifica macromoléculas e ativa o sistema antioxidante como visto na L3, na tentativa de proteger o organismo, combatendo os ROS intracelulares devido a uma alta capacidade antioxidante através da ativação do sistema superóxido dismutase e catalase.

A larva de primeiro ínstar começa a se alimentar imediatamente na superfície do meio contendo AAPH e passa por duas mudas posteriores. As larvas de segundo ínstar enterram-se no meio e, quando a larva de terceiro ínstar está madura, ela deixa o meio de cultura e vagueia pelas paredes do frasco, procurando um local para realizar a pupação (FERNÁNDEZ-MORENO et al., 2007). Devido a esse comportamento e pela estabilidade do composto utilizado, foi investigado se poderia ocorrer a ingestão oral do alimento junto com AAPH e causar danos no trato gastrointestinal da larva em 3 ínstar.

Os resultados mostraram um aumento substancial da permeabilidade do trato gastrointestinal das larvas expostas ao AAPH, sendo uma extensão fisiológica dos danos provocados pela sua ingestão. A matriz peritrófica (PM) é uma estrutura acelular que reveste o intestino da maioria dos insetos. É um alvo atraente para estratégias de manejo de pragas devido ao seu envolvimento nos processos digestivos e ao papel de barreira contra patógenos e toxinas (SANDOVAL-MOJICA E SCHARF., 2016). Embora estruturalmente diferente, desempenha um papel análogo ao das secreções mucosas do trato digestivo dos vertebrados e acredita-se que proteja o epitélio do intestino médio de

partículas abrasivas de alimentos e micróbios, possuindo função vital para o desenvolvimento adequado desses organismos.

Já foram demonstrados danos proteicos provocados pelo AAPH em células intestinais humanas, através da modificação oxidativa de proteínas importantes na adesão celular (FINAMORE et al., 2018). A fosforilação de resíduos de tirosina específicos e outras modificações de proteínas, como oxidação de tiol, nitração e carbonilação, tem sido mostrado como o fator precursor envolvido na ruptura induzida por estresse oxidativo de zonas de oclusão, através do ROS como: peróxido de hidrogênio, óxido nítrico, peroxinitrito, e ácido hipocloroso, em um processo que resulta no rompimento da morfologia das junções celulares e na perda das funções de barreira epitelial e endotelial. Além disso, as ROS podem oxidar a actina e a tubulina, causando a desmontagem da F-actina e da tubulina, o que leva à ruptura do citoesqueleto e disfunções da barreira intestinal (RAO et al., 2002).

A exposição e ingestão ao AAPH também levou a um aumento da caspase-3 clivada no trato gastrointestinal das larvas, a CC3 é descrita como uma enzima que atua na apoptose, sendo amplamente utilizada como marcador de células apoptóticas (Ansari et al., 2017). Envolve uma ampla variedade de estímulos, que incluem muitos sinais de desenvolvimento diferentes, bem como várias formas de estresse ou lesão celular, como danos ao DNA, proteínas não enoveladas, estresse do retículo endoplasmático, espécies reativas de oxigênio e defeitos na especificação ou diferenciação celular (STELLER., 2008). O anticorpo CC3 reage de forma cruzada em outras espécies e detecta caspases clivadas, principalmente DrICE e Dcp-1, caspases efetoras semelhantes a Caspase-3 em *Drosophila* (FOGARTY e BERGMANN., 2014), e marca também pelo menos uma proteína desconhecida adicional, todas as quais requerem DRONC para exposição ao epítipo. As alterações vistas nesse tecido são compatíveis com os possíveis danos causados pelo AAPH, como os danos oxidativo, disfunção na fisiologia do trato gastrointestinal e morte celular. Isso sugere que a capacidade do intestino larval em desenvolvimento de lidar com danos oxidativo, pode ser particularmente limitada.

À medida que o número de aplicações de pontos quânticos (QDs) cresce, a probabilidade de exposição aumenta. Como esses metais têm potencial para efeitos nocivos ao meio ambiente e à saúde, surgem preocupações sobre nossa falta de compreensão sobre o destino desses produtos e as possíveis exposições. Quantum dots possui propriedades ópticas muito interessantes e vem sendo usada cada vez mais em numerosas aplicações, por isso entender seus efeitos em modelos biológicos vivos é muito importante. Entre os vários

tipos de QDs, os pontos quânticos baseados em cádmio atraem a maior atenção devido às suas amplas aplicações (WANG et al., 2013). Os íons de cádmio que estão associados na superfície do QDs podem ser liberados no interior da célula e pode indiretamente aumentar a formação de espécies reativas de oxigênio no citoplasma (CUYPERS et al., 2010). E pode interagir com o sistema antioxidante através da sua alta afinidade por tióis, os íons de cádmio reduzem os níveis de glutathione reduzindo, levando a um processo oxidativo perturbando o estado redox da célula podendo gerar danos estruturais (LOPEZ et al., 2006; VILELA et al., 2021).

Como mostrado, o QD CdSe 0,3 mg/mL foi capaz de gerar danos celulares no epitélio do trato gastrointestinal da larva levando ao aumento da permeabilidade intestinal no ensaio *smurf* derivado da sua co-ingestão, e aumento de apoptose e toxicidade desenvolvimental. A notável integridade da função da barreira intestinal permite que ele resista às agressões diárias dos produtos químicos aos quais está exposto, além de fornecer o suporte nutricional necessário ao organismo (GUZMAN et al., 2020). Achados similares foram demonstrados por (YANG et al., 2022) que mostrou danos celulares em larvas de *Drosophila* sob exposição ao cádmio, sendo demonstrando danos no intestino médio pelo aumento do extravasamento do corante azul, além do aumento do conteúdo de ROS e danos no DNA.

Nanomateriais de ponto quântico de cádmio-selênio (*CdSe* QDs) já foram avaliados quanto a sua citotoxicidade *in vitro*, como no carcinoma hepatocelular onde foi observado mortes celulares por encolhimento, ruptura de membrana e expressão de genes apoptóticos (RAHMAN; OPO; ASIRI, 2021). E quanto ao extravasamento de *Cd* e *Se*, foi mostrado que se o QD *CdSe* é funcionalizado em nanopartículas de vidro sua citotoxicidade foi reduzida em queratinócitos humanos (ANDO et al., 2016). Demonstrado que a etapa de síntese de nanopartículas deve levar em consideração a eventual toxicidade do composto se vazado. Foi demonstrado os efeitos do revestimento de nanopartículas de CdSe/ZnS na toxicidade celular, e a composição do ligante é mais importante na geração de ROS do que a carga de superfície, enquanto a carga de superfície é um importante fator de citotoxicidade (ZHENG et al., 2017).

Além disso, já foi demonstrado que a exposição ao cádmio em larvas de *Drosophila* é capaz de aumentar a expressão dos genes que codifica a adenina nucleotídeo transferase mitocondrial (*sesB* e *Ant2*), e ativar genes envolvidos com o aumento dos níveis de apoptose (YANG et al., 2022). Alterações na expressão desses genes também podem alterar o potencial de membrana nas mitocôndrias e levar a um aumento prejudicial no

conteúdo de ROS e mais danos ao DNA. Foi demonstrado por uma abordagem proteômica em células hepáticas e larvas de zebra-fish (GARCIA-CALVO et al., 2021) expostas ao CdSe funcionalizado com ZnS, que a exposição causa hipoxia e geração de ROS que leva a apoptose, por ativação da via TDP-43. Além de ter alto impacto em organismos em desenvolvimento, podendo induzir graves problemas neurais e locomotores.

De forma interessante, foi mostrado a toxicidade de QD utilizando um modelos vivos, sendo demonstrado que a concentração de Se na composição do quantum dot de Cd^{2+} impacta diretamente na sua citotoxicidade, através da sua interação com os íons de Cd^{2+} em modelo de embrião de galinha (VILELA et al., 2021). Isso se deve, pois os íons de selênio se ligam aos íons Cd^{2+} na superfície de CdSe MSQDs diminuindo a quantidade de Cd^{2+} livres, alterando a citotoxicidade. Além da concentração de Se impactar na redução da toxicidade, ela pode até apresentar efeitos terapêuticos positivos. Foi demonstrado experimental *in vivo* e *in vitro*, efeitos antioxidantes de CdSe MSQDs em neutrófilos e macrófagos sendo capazes de atenuar a produção de EROs por estas células, além de não impactar na viabilidade celular (SARAIVA et al., 2022), além de apresentarem atividade *scavenger* em combater radicais. Demonstrando que controlar a densidade de Se na superfície da nanopartícula representa uma estratégia interessante para redução da toxicidade de QDs.

Ao contrário da maioria dos tecidos epiteliais, como o intestino médio de *Drosophila* adulta (BUCHON et al., 2010), o epitélio do intestino médio de *Drosophila* larval possui pouca presença de células progenitoras para mediar a renovação constante (MATHUR et al., 2010), provavelmente devido a a natureza transitória dos tecidos larvais. No entanto, o intestino médio larval é exposto a desafios ambientais, como poluentes tóxicos e bactérias. O epitélio larval de *Drosophila* contém enterócitos absorptivos (ECs) e células enteroendócrinas secretoras (EEs). No entanto, em contraste com sua contraparte adulta, não sofre renovação epitelial contínua (JIANG e EDGAR, 2009; MICCHELLI et al., 2011). Assim, durante o desenvolvimento larval, o intestino médio não cresce em tamanho pelo aumento do número de CEs, mas sim pelo aumento do tamanho e ploidia de um determinado número de CEs larvais (DURONIO, 1999).

Além disso, uma forte expressão de CC3 foi observada em um grupo de células conhecidas como corpos gordurosos. O corpo gorduroso é semelhante ao fígado e tecido adiposo que armazena gordura e serve como um órgão de desintoxicação e resposta imune (MUSSELMAN et al., 2013), as larvas de drosófila continuamente comem e armazenam gordura para metamorfose à medida que se desenvolvem. As alterações no tamanho das células devem-se em grande parte ao acúmulo ou perda de substâncias de

reserva: gotículas lipídicas, depósitos de glicogênio e grânulos de proteínas.

Os organismos requerem processos de desenvolvimento robustos para garantir sua transição viável para adultos, os nossos resultados mostraram que a exposição ao AAPH induz letalidade e atraso no desenvolvimento de larvas de *Drosophila*. Além disso, a exposição ao QD CdSe 0,3 mg/mL também gerou danos na larva em desenvolvimento, mostrando que esses dois modelos; um orgânico usando um composto que gera radicais peróxido no meio leva a prejuízos desenvolvimentais e que a exposição ao QD é capaz de gerar danos similares a esse modelo.

A progressão rigidamente regulada do desenvolvimento pode interferir na capacidade regenerativa dos organismos em maturação. As larvas em especial possuem um reparo tecidual limitado do seu intestino ao contrário do adulto, em vez disso, ocorre um reparo tecidual não efetivo e mantém o intestino em um estado encurtado até o momento da pupação, o que pode tornar esses organismos em desenvolvimento mais susceptíveis a infecções e disfunções metabólicas (HOUTZ et al., 2019), reduzindo o número na geração de indivíduos saudáveis.

Além da toxicidade, o atraso no desenvolvimento pode ser explicado como um mecanismo compensatório aos danos sofridos, pois permite ao organismo uma recuperação mais adequada, já que a regeneração é incompleta. Isso pode sugerir dois cenários: primeiro, é possível que o reparo do intestino em larvas seja limitado para manter um número suficiente de precursores de intestino médio adulto (AMPs) para o desenvolvimento do epitélio do intestino médio adulto. Alternativamente, é possível que o número de AMPs presentes no momento do dano seja um fator limitante, e não seja suficiente para atenuar os danos nas larvas acometidas.

Sendo assim, uma consequência do uso das células imaginárias para reparar o intestino médio da larva sem aumentar a proliferação é a necessidade de um período de crescimento larval prolongado, para repor as células antes da pupação (KEITHA et al., 2017; HOUTZ, et al., 2019).

Nesse contexto, nossos resultados mostram que o estresse oxidativo induzido por AAPH pode interferir em etapas cruciais associadas à morfogênese intestinal de larvas de *drosophilas*, podendo causar danos sistêmicos notáveis, como disfunção fisiológica e morte celular e que a exposição ao QD na concentração de 0,3 mg/mL é capaz de gerar prejuízos e alterações similares, demonstrando toxicidade *in vivo*.

Comparando os dois compostos; um com geração de EROs constantes e outro um composto ambíguo metal e mineral, notamos que a exposição a danos constantes nessa concentração desafia o organismo em desenvolvimento a se defender apresentando atividades antioxidantes estimulada mas com presença de danos oxidativos estruturais, pois a geração de danos provocados pelo AAPH supera a velocidade do organismo em se reparar. Quando expomos a um composto limitado em gerar EROs, o sistema antioxidante também é ativado mas consegue sobrepor os danos e reparar com mais eficiência, mostrando que a composição e concentração de Se e Cd^{2+} na superfície do QD está envolvido nos níveis de toxicidade.

Nossos resultados também indicam um modelo que permite estudar o estresse oxidativo e danos no sistema gastrointestinal embrionário em desenvolvimento, além de poder ser utilizado como ferramenta para triagem de moléculas com potencial antioxidante e protetor.

7. Conclusão

- O desenvolvimento larval na presença de AAPH na concentração 30 mM é capaz de gerar danos estruturais e celulares na larva de terceiro ínstar de *Drosophila melanogaster*, causando um desequilíbrio no sistema redox, através do aumento da atividade do sistema SOD-CAT na tentativa de reduzir a presença de moléculas oxidantes, geração de danos oxidativos proteicos e lipídicos com consequente redução na viabilidade larval. Além disso, demonstrou aumentar a caspase-3, um forte mediador da morte celular programada nas células do trato gastrointestinal, pela ingestão oral de AAPH.

- A exposição aos pontos mágicos de tamanhos quânticos de selenato de cádmio é dependente da concentração e dose para gerarem prejuízos no modelo de desenvolvimento larval. Sendo mostrado que, a exposição na concentração de 0,3 mg/mL é capaz de aumentar a atividade da linha de defesa primaria antioxidante, sendo ela capaz de inibir a geração de danos oxidativos. Mas a ingestão oral provoca danos no intestino médio, através do aumento de morte celular e extravasamento.

8. Referência bibliográfica

ALMEIDA SILVA, A. C.; SILVA, M. J. B.; DA LUZ FAC, 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 Lett.** 2014;14 (9):5452-5457. <https://doi.org/10.1021/nl5028028>

ALLOCCA, M., ZOLA, S., BELLOSTA, P.'The Fruit Fly, *Drosophila melanogaster*: The Making of a Model (Part I)', in F. K. Perveen (ed.), *Drosophila melanogaster - Model for Recent Advances in Genetics and Therapeutics*, **IntechOpen**, 2018. London. 10.5772/intechopen.72832. <https://doi.org/10.5772/intechopen.72832>

ALKADI, H. A Review on Free Radicals and Antioxidants. **Infect. Disord. Drug Targets**, 2020, 20, 16–26. <https://doi.org/10.2174/1871526518666180628124323>

ANDING, A. L.; BAEHRECKE, E. H. Autophagy in cell life and cell death. *Current Topics in Developmental Biology*. 2015;114:67-91 <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2015.07.012>

ANDO, M., HORIE, M., AKAZAWA-OGAWA, Y., HAGIHARA, Y., MURASE, N., SHIGERI, Y. Cytotoxicity of CdSe-based quantum dots incorporated in glass nanoparticles evaluated using human keratinocyte HaCaT cells. **Biosci Biotechnol Biochem.** 2016; 80(1):210-3. doi: 10.1080/09168451.2015.1069702.

BARAIBAR, M.A.; BARBEITO, A. G.; MUHOBERAC, B. B.; AND VIDAL, R. A mutant light-chain ferritin that causes neurodegeneration has enhanced propensity toward oxidative damage. **Free Radical Biology and Medicine**, vol. 52, no. 9, pp. 1692–1697, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.02.015>

BUCHON, N.; BRODERICK, N.A.; KURAISHI, T.; LEMAITRE, B. *Drosophila* EGFR pathway coordinates stem cell proliferation and gut remodeling following infection. **BMC Biol**, 2010. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-8-152>

BANGI, E. Strategies for functional interrogation of big cancer data using drosophila cancer models. **International Journal Molecular Science**, 2020. <https://doi.org/10.3390/ijms21113754>

BRAVO, J. et al. Crystal structure of catalase HP11 from *Escherichia coli*. **Structure**, v. 3, p. 491–502, 1995. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(01\)00182-4](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(01)00182-4)

BRUNETTI, V., CHIBLI, H., FIAMMENGIO, R., GALEONE, A., MALVINDI, M. A., VECCHIO, G. InP/ZnS as a safer alternative to CdSe/ZnS core/shell quantum dots: in vitro and in vivo toxicity assessment. **Nanoscale** 5 (1), 307–317, 2013. doi: 10.1039/C2NR33024E

CAMPBELL, E.L.; COLGAN, S.P. Control and dysregulation of redox signalling in the gastrointestinal tract. **Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.** 2019, *16*, 106–120. <https://doi.org/10.1038/s41575-018-0079-5>

CARMO, M. K. B.; FIGUEIREDO, M. O. V.; SOUZA, J. M.; SOUZA, A. O.; LIMA, C. A. C. Neuroprotective action of aspirin on Paraquat intoxication in on *Drosophila melanogaster*. Research, Society and Development, [S. l.], v. 10, n. 4, p. e30710414179, 2021. doi: 10.33448/rsd-v10i4.14179

CUYPERS, A.; PLUSQUIN, M.; REMANS, T.; et al. Cadmium stress: an oxidative challenge. *Biometals*. 2010;23(5):927-940. <https://doi.org/10.1007/s10534-010-9329-x>

CICHOŹ-LACH, H.; MICHALAK, A. Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases. **World J. Gastroenterol.** 20, 8082–8091, 2014. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i25.8082>

D'AUTRÉAUX, B.; TOLEDANO, M. B. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. **Nature reviews**, v. 8, p. 813–824, 2007. <https://doi.org/10.1038/nrm2256>

DURONIO, R.J. Establishing links between developmental signaling pathways and cell-cycle regulation in *Drosophila*. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, 9 (1999), pp. 81-88. [https://doi.org/10.1016/S0959-437X\(99\)80012-4](https://doi.org/10.1016/S0959-437X(99)80012-4)

FERNÁNDEZ-MORENO, M. A.; FARR, C. L.; KAGUNI, L. S.; GARESSE, R. *Drosophila melanogaster* as a model system to study mitochondrial biology. **Methods Mol Biol.** 2007;372:33-49. doi: 10.1007/978-1-59745-365-3_3.

FINAMORE A, AMBRA R, NOBILI F, GARAGUSO I, RAGUZZINI A, SERAFINI M. Redox Role of *Lactobacillus casei* Shirota Against the Cellular Damage Induced by 2,2'-Azobis (2-Amidinopropane) Dihydrochloride-Induced Oxidative and Inflammatory Stress in Enterocytes-Like Epithelial Cells. **Front Immunol.** 2018. doi: 10.3389/fimmu.2018.01131.

FISCHER, H. C.; CHAN, W. C. Nanotoxicity: The growing need for in vivo study. **Curr. Opin. Biotechnol.** 2007, 18, 565–571. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.11.008>

FOGARTY, C. E.; BERGMANN, A. Detecting caspase activity in *Drosophila* larval imaginal discs. **Methods Mol Biol.** 2014. doi: 10.1007/978-1-4939-0357-3_7.

FREIRE-MAIA, N.; PAVAN, C. 1949. Introdução ao estudo da *Drosophila* . **Cultus** 5:1-70

GARCIA-CALVO, E; CABEZAS-SANCHEZ, P; LUQUE-GARCIA, J.L. In-vitro and in-vivo evaluation of the molecular mechanisms involved in the toxicity associated to CdSe/ZnS quantum dots exposure. **Chemosphere**, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128170>.

GOODSELL, D.S. Catalase. Molecule of the Month. **RCSB Protein Data Bank.** (2004). https://doi.org/10.2210/rcsb_pdb/mom_2004_9

GIORGIO, M.; TRINEI, M.; MIGLIACCIO, E.; PELICCI, P.G. Hydrogen peroxide: A metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** 2007, 8, 722–728. <https://doi.org/10.1038/nrm2240>

GUPTA, V.; CARROLL, K.S. Sulfenic acid chemistry, detection and cellular lifetime. **Biochim. Biophys. Acta BBA-Gen. Subj.** 2014, 1840, 847–875. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.05.040>

HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J. M. C. Free Radicals in Biology and Medicine 5th edn (Oxford Univ. Press, 2015). <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198717478.001.0001>

HOUTZ, PHILIP; BONFINI, ALESSANDRO; BING, XIAOLI; BUCHON, NICOLAS. Recruitment of Adult Precursor Cells Underlies Limited Repair of the Infected Larval Midgut in *Drosophila*. **Cell Host & Microbe**, v. 26, n. 3, p. 412-425, 2019. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2019.08.006>.

JIANG, H., EDGAR, B. A. EGFR signaling regulates the proliferation of *Drosophila* adult midgut progenitors. **Development**, 136 (2009), pp. 483-493. <https://doi.org/10.1242/dev.026955>

JOHNSON, A. A.; STOLZING, A. The role of lipid metabolism in aging, lifespan regulation, and age-related disease. **Aging Cell**, (2019). <https://doi.org/10.1111/ace1.13048>

KALOUSOVÁ, M.; SKRHA, J.; ZIMA, T. Advanced Glycation End-Products and Advanced Oxidation Protein Products in Patients with Diabetes Mellitus. **Physiol. Res.**, v. 51, n. 2, p. 597-604, 2002.

KEITA, S; MASUZZO, A; ROYET, J; KURZ, C. L. *Drosophila* larvae food intake cessation following exposure to *Erwinia* contaminated media requires odor perception, Trpa1 channel and evf virulence factor J. Insect Physiol. 2017, pp. 25-32. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2017.02.004>

KORNBLUTH, S.; WHITE, K. Apoptosis in *Drosophila*: neither fish nor fowl (nor man, nor worm) **J. Cell Sci.** 2005;118:1779–1787. <https://doi.org/10.1242/jcs.02377>

KURASHI, T.; BINGGELI, O.; OPOTA, O.; BUCHON, N.; LEMAITRE, B. Genetic evidence for a protective role of the peritrophic matrix against intestinal bacterial infection in *Drosophila melanogaster*. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2011 Sep 20;108(38):15966-71. <https://doi.org/10.1073/pnas.1105994108>

LEHANE, M. J. Peritrophic matrix structure and function. **Annu Rev Entomol.** 1997; 42:525–550. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.42.1.525>

LEI, Z., HENDERSON, K.; KELEMAN, K. A neural circuit linking learning and sleep in *Drosophila* long-term memory. *Nat Commun*, 609 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28256-1>

LESLIE, J. S.; ROSALIE, E. T.; KATE, E. S. How *Drosophila* Can Inform the Emerging Paradigm of the Role of Antioxidants in Cancer. *Mol Cancer Res* 1 January 2021; 19 (1): 38–41. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-20-0172>

LIMÓN-PACHECO AND GONSEBATT. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen*, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2008.09.015>

LIN, G. M.; LI, L.; PANWAR, N.; WANG, J.; TJIN, S. C.; WANG, X. M. Non-viral gene therapy using multifunctional nanoparticles: status, challenges, and opportunities. *Coord. Chem. Rev*, 2018. doi: 10.1016/j.ccr.2018.07.001

LOEW. A new enzyme of general occurrence in organisms. *Science*, v. 11, n. 279, p. 701–702, 1900. <https://doi.org/10.1126/science.11.279.701>

LOPEZ, E., ARCE, C., OSET-GASQUE, M. J., CAÑADAS, S., GONZÁLEZ, M. P. Cadmium induces reactive oxygen species generation and lipid peroxidation in cortical neurons in culture. *Free Radic Biol Med*. 2006;40(6): 940-951. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.10.062>

MANSHIAN, B. B.; MARTENS, T. F.; KANTNER, K.; BRAECKMANS, K.; DE SMEDT, S. C.; DEMEESTER, J. The role of intracellular trafficking of CdSe/ZnS QDs on their consequent toxicity profile. *J. Nanobiotechnol*, 2017. doi: 10.1186/s12951-017-0279-

MATHUR, D.; BOST, A.; DRIVER, I.; OHLSTEIN, B. A transient niche regulates the specification of *Drosophila* intestinal stem cells. *Science*, 327 (2010), pp. 210-213 <https://doi.org/10.1126/science.1181958>

MATTOUSSI, H.; MAURO, J. M.; GOLDMAN, E. R.; ANDERSON, G. P.; SUNDAR, V. C.; MIKULEC, F. V. Self-assembly of CdSe-ZnS quantum dot bioconjugates using an engineered recombinant protein. *J. Am. Chem. Soc*, 2000. doi: 10.1021/ja002535y

MEAGHER, E. A.; FITZGERALD, G. A. Indices of lipid peroxidation in vivo: strengths and limitations. *Free Rad Biol Med*.v. 28, p. 1745-1750, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(00\)00232-X](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00232-X)

MICCHELLI, C. A; SUDMEIER, L; PERRIMON, N; TANG, S; BEEHLER-EVANS, R. Identification of adult midgut precursors in *Drosophila*. *Gene Expr. Patterns*, 11 (2011), pp. 12-21 <https://doi.org/10.1016/j.gep.2010.08.005>

MEIGEN, J.W. 1830. Systematische Beschreibung der bekannten europäischen zweiflügeligen Insekten. *Sechster Theil*. Schulz, Hamm

MORAES, K. C. M.; MONTAGNE, J. *Drosophila melanogaster*: A Powerful Tiny Animal

Model for the Study of Metabolic Hepatic Diseases. **Front Physiol.** 2021. doi: 10.3389/fphys.2021.728407

MURASE, N., HORIE, M., SAWAI, T., KAWASAKI, K. Silica layer-dependent leakage of cadmium from CdSe/ZnS quantum dots and comparison of cytotoxicity with polymer-coated analogues. **J. Nanoparticle Res.** (2019). doi: 10.1007/s11051-018-4449-2

OLIVEIRA, I. G., et al. Avaliação comparativa dos efeitos tóxico-genéticos da própolis em células somáticas de *Drosophila melanogaster*, portadoras de diferentes níveis de enzimas de metabolização. **Revista de Biologia Neotropical.** v. 4, n.1, p. 64-69, nov. 2007. <https://doi.org/10.5216/rbn.v4i1.4658>

PANDEY, S.; BODAS, D. High-quality quantum dots for multiplexed bioimaging: a critical review. **Adv. Colloid Interface Sci.** 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102137>

PEREZ-SEVERIANO, F.; SANTAMARIA, A.; PEDRAZA-CHAVERRI, J.; MEDINACAMPOS, O. N.; RIOS, C.; SEGOVIA, J. Increased formation of reactive oxygen species, but no changes in glutathione peroxidase activity, in striata of mice transgenic for the Huntington's disease mutation. **Neurochem Res.** (2004). 29:729–733 <https://doi.org/10.1023/B:NERE.0000018843.83770.4b>

PRUCHNIAK, M.P.; ARAŽNA, M.; DEMKOW, U. Biochemistry of Oxidative Stress. **Adv. Exp. Med. Biol.** 2016, 878, 9–19. https://doi.org/10.1007/5584_2015_161

RAO, R. K.; BASUROY, S.; RAO, VU.; KARNAKY, K. J.; J. R, GUPTA, A. Tyrosine phosphorylation and dissociation of occludin-ZO-1 and E-cadherin-beta-catenin complexes from the cytoskeleton by oxidative stress. **Biochem J** (2002) 368:471–81. doi: 10.1042/bj20011804

RAHMAN, M. M.; OPO, FADM.; ASIRI, A. M. Cytotoxicity Study of Cadmium-Selenium Quantum Dots (Cdse QDs) for Destroying the Human HepG2 Liver Cancer Cell. **J Biomed Nanotechnol.** 2021 doi: 10.1166/jbn.2021.3181

SADASIVAM, N.; KIM, Y.-J.; RADHAKRISHNAN, K.; KIM, D.-K. Oxidative Stress, Genomic Integrity, and Liver Diseases. **Molecules**, 2022, 27, 3159. <https://doi.org/10.3390/molecules27103159>

SALVADOR, M.; HENRIQUES, J. A. P. Radicais livres e a resposta celular ao dano oxidativo. 1ª edição. Canoas, RS: editora ULBRA, 2004

SANDOVAL-MOJICA A, F.; SCHARF, M. E. GUT GENES ASSOCIATED WITH THE PERITROPHIC MATRIX IN *Reticulitermes flavipes* (Blattodea: Rhinotermitidae): IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION. **Arch Insect Biochem Physiol**, 2016. doi: 10.1002/arch.21325.

SARAIVA, A. L.; VIEIRA, T. N.; NOTÁRIO A. F. O.; LUIZ, J. P. M.; SILVA C. R., et al.

CdSe magic-sized quantum dots attenuate reactive oxygen species generated by neutrophils and macrophages with implications in experimental arthritis, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, Volume 42, 2022, 102539, ISSN 1549-9634, <https://doi.org/10.1016/j.nano.2022.102539>

SIES, H. Biochemistry of Oxidative Stress. **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.** 1986, 25, 1058–1071 <https://doi.org/10.1002/anie.198610581>

SIES, H.; JONES, D.P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** 2020, 21,363–383. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0230-3>

SIES, H. Oxidative Stress: A Concept in Redox Biology and Medicine. **Redox Biology**, 2015, 4, 180–183. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.01.002>

SHAPOSHNIKOV, M. V., GUVATOVA, Z. G., ZEMSKAYA, N.V. et al. Molecular mechanisms of exceptional lifespan increase of *Drosophila melanogaster* with different genotypes after combinations of pro-longevity interventions. *Commun Biol* 5, 566 (2022). <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03524-4>

SHI, J.P.; EVANS, D.E.; KHAN, A.; HARRISON, R.M. Sources and concentration of nanoparticles (<10 nm diameter) in the urban atmosphere. **Atmos. Environ.** 2001, 35, 1193–1202 [https://doi.org/10.1016/S1352-2310\(00\)00418-0](https://doi.org/10.1016/S1352-2310(00)00418-0)

SHINODA, NATSUKI; HANAWA, NOZOMI; CHIHARA, TAKAHIRO; KOTO, AKIKO; MIURA, MASAYUKI. Dronc-independent basal executioner caspase activity sustains *Drosophila* imaginal tissue growth. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, 2019 <https://doi.org/10.1073/pnas.1904647116>

STADTMAN, E., LEVINE, R. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. **Amino Acids** , 25, 207–218 (2003). <https://doi.org/10.1007/s00726-003-0011-2>

STELLER, H. Apoptose regulation in *Drosophila*. **Cell Death Differ**, 2008. <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.50>

STRITAK, A. S; SATHIAMOORTHY, P.S.; TANG, K.M.; TSOI, F.; SONG, J.B.; ANDERSON, W.C.W.; CHAN, J.A. Yeast populations evolve to resist CdSe quantum dot toxicity. **Bioconj. Chem.**, (2017), pp. 1205-1213 <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.7b00056>

TARRAHI, R; MOVAFEGHI, A; KHATAEE, A; REZANEJAD, F; GOHARI, G. Evaluating the Toxic Impacts of Cadmium Selenide Nanoparticles on the Aquatic Plant *Lemna minor*. **Molecules** , 2019. <https://doi.org/10.3390/molecules24030410>

TELES, Yanna Carolina Ferreira et al. O papel do estresse oxidativo na síndrome metabólica. *J Health SciInst*, v. 33, p. 89-93, 2015.

VASUDEVAN, D.; RYOO, H. D. Detection of Cell Death in Drosophila Tissues. **Methods Mol Biol.** 2016;1419:131-44. doi: 10.1007/978-1-4939-3581-9_11.

VILELA, D. D.; JUSTINO, A. B.; CAIXETA, D. C., et al. Increased selenium concentration in the synthesis of CdSe magic-sized quantum dots affects how the brain responds to oxidative stress. *J Biomed Mater Res.* 2021;1-11. doi:10.1002/jbm.b.34988

WANG, F.; SHU, L.; WANG, J.; PAN, X.; HUANG, R.; LIN, Y.; CAI, X. Perspectives on the toxicology of cadmium-based quantum dots. **Curr Drug Metab.** 2013 Oct;14(8):847-56. doi: 10.2174/138920021131400106.

WU, Y.W.; WANG, Q.Y.; WU, T.T.; LIU, W.; NAN, H.X.; XU, S.H.; SHEN, Y.Z. Detection and imaging of hydrogen sulfide in lysosomes of living cells with activatable fluorescent quantum dots. **ACS Appl. Mater. Interfaces**, 2018, pp. 43472-43481 <https://doi.org/10.1021/acsami.8b16971>

WITKO-SARSAT, V.; FRIEDLANDER, M.; CAPEILLÈRE-BLANDIN, C.; NGUYEN-KHOA, T.; NGUYEN, A. T.; ZINGRAFF, J.; JUNGERS, P.; DESCAMPS-LATSCHA, B. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. **Kidney Int.** 1996 May;49(5):1304-13 <https://doi.org/10.1038/ki.1996.186>

WHITE, Blaine C. *et al.* Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 179, n. 1-2, p. 1-33, out. 2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0022-510x\(00\)00386-5](https://doi.org/10.1016/s0022-510x(00)00386-5)

YANG, P., YANG, X., SUN, L., HAN, X., XU, L., GU, W., ZHANG, M. Effects of cadmium on oxidative stress and cell apoptosis in Drosophila melanogaster larvae. *Sci Rep.* 2022 Mar 19;12(1):4762. doi: 10.1038/s41598-022-08758-0.

ZHANG Y, LIN N, CARROLL PM, CHAN G, GUAN B, XIAO H, YAO B, WU SS, ZHOU L. Epigenetic blocking of an enhancer region controls irradiation-induced proapoptotic gene expression. **Dev. Cell.** 2008;14:481–493 doi.org/10.1016/j.devcel.2008.01.018

ZHENG, H.; MORTENSEN, L. J.; RAVICHANDRAN, S.; BENTLEY, K.; DELOUISE, L. A. Effect of Nanoparticle Surface Coating on Cell Toxicity and Mitochondria Uptake. **J Biomed Nanotechnol.** 2017 doi: 10.1166/jbn.2017.2337.

ZHENG, H.; MORTENSEN, L. J.; DELOUISE, L. A. Thiol antioxidant-functionalized CdSe/ZnS quantum dots: synthesis, characterization, cytotoxicity. **J Biomed Nanotechnol.** Mar;9(3):382-92. 2013 doi: 10.1166/jbn.2013.1561